

ENCYCLOPÉDIE PÉRIODIQUE DES SCIENCES MÉDICO-BILOGIQUES

Section : MICROBIOLOGIE ET APPLICATIONS A LA BIOLOGIE

1943

ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

FONDÉES SOUS LE PATRONAGE DE L. PASTEUR

PAR E. DUCLAUX

ET CONTINUÉES PAR

E. ROUX (1904)

A. CALMETTE (1922)

COMITÉ DE DIRECTION

**Gab. BERTRAND, E. LECLAINCHE, L. MARTIN,
G. RAMON, J. TREFOUËL,**

assistés des Professeurs et Chefs de service de l'Institut Pasteur,

Secrétaire général : A. BOQUET.



PARIS

MASSON ET C^{ie}, ÉDITEURS

LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

120, Boulevard Saint-Germain (6^e)

SOMMAIRE DES N^{os} 9-10

	Pages.
Nouvelle réaction de floculation de la lèpre, par V. CHORINE	257
Actions primaires comparées des rayons X et ultraviolets sur la levure <i>Saccharomyc es ellipsoideus</i> , par RAYMOND LATARJET	277
Caractères toxiques et antigéniques des extraits trichloracétiques des souches d' <i>aero-bacter</i> d'origine intestinale, par R. PIROT, M. BOURGAIN et J. DUFAU-CASANABE. . . .	281
Sur la nature des composés antigène-anticorps et sur leur solubilité, par D. DERVICHIAN. .	291
Association des microbiologistes de langue française (sommaire page 4 de la couverture).	302

Œuvres de Pasteur réunies par PASTEUR VALLERY-RADOT, tome VII « Mélanges scientifiques et littéraires. Index analytique de l'œuvre de Pasteur ». Un vol. gr. in-8° de 666 pages. Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1939 : 200 fr. (5 dollars 25).

Albert Calmette. Sa vie. Son œuvre scientifique, par P. NOËL BERNARD et LÉOPOLD NÈGRE. Préface de Pasteur Vallery-Radot. Avant-propos de A. Yersin. Un vol. de 274 pages. Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1939 : 50 fr. (1 dollar 15).

J. BORDET. — Traité de l'immunité dans les maladies infectieuses. Deuxième édit. Un volume de 880 pages. Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1939 : 175 fr. (3 dollars 90).

ANDRÉ-R. PRÉVOT. — Manuel de classification et de détermination des bactéries anaérobies. Un volume in-8° de 228 pages (Monographie de l'Institut Pasteur). Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1940 : 50 fr. (1 dollar 15).

MARGUERITE LWOFF. — Recherches sur le pouvoir de synthèse des flagellés trypanosomides. Un vol. de 244 pages (Monographie de l'Institut Pasteur). Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1941 : 50 fr. (1 dollar 15).

L. NÈGRE et J. BRETEY. — Vaccination par le B.C.G. par scarifications cutanées. Préface du professeur A. Marfan. Un vol. de 104 pages avec 48 fig. (Collection Médecine et Chirurgie : Recherches et applications). Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1942 : 25 fr.

L. JUSTIN-BESANÇON et A. LWOFF. — Vitamine antipellagreuse et avitaminoses nicotiniques. Un vol. de 288 pages. Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1942 : 90 fr.

MADELEINE MOREL. — L'acide nicotinique facteur de croissance pour « *Proteus vulgaris* » (Monographie de l'Institut Pasteur). Masson et C^{ie} édit., Paris, 1943 : 65 fr.

ANDRÉ LWOFF, chef de Service à l'Institut Pasteur. — L'évolution physiologique. Etude des pertes de fonctions chez les Micro-organismes. Hermann et C^{ie}, édit., Paris, 1944 : 215 fr.

N. B. — Le paiement est accepté en toutes monnaies étrangères au cours du dollar au moment du règlement.

PRIX DE L'ABONNEMENT POUR 1944

France et Colonies françaises : 190 fr.; Étranger : 280 fr.; Prix du numéro : 36 fr.
Changement d'adresse : 1 fr.

Secrétariat, 25, rue du Dr Roux, Paris (XV^e).

Cette Revue constitue une des sections de
L'ENCYCLOPÉDIE PÉRIODIQUE DES SCIENCES MÉDICO-BIOLOGIQUES

Prix d'abonnement à l'ensemble des 25 Sections

France et Colonies : 3.700 Fr.

Étranger : Tarif I, 5.500 Fr.; Tarif II, 5.650 Fr.

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

NOUVELLE RÉACTION DE FLOCCULATION DE LA LÈPRE

par V. CHORINE.

Introduction.

Les recherches sur la sérologie de la lèpre sont très nombreuses. Nous n'allons pas exposer les résultats d'innombrables travaux qui pour la plupart n'ont actuellement qu'un intérêt historique. On trouvera une revue détaillée de cette question dans les ouvrages de Marchoux [8], de Jeanselme [4] et de Klingmüller [5].

Cependant, il est utile de signaler qu'au point de vue pratique il n'existe pas de réaction ayant une valeur clinique réelle pour le diagnostic et pour le pronostic de la maladie de Hansen. La réaction la plus anciennement connue est celle qu'Eitner a proposée en 1906 : elle consiste dans la déviation du complément avec l'extrait aqueux de lépromes humains [1]. Elle a joui d'une vogue considérable pendant quelques années et nombreuses sont les études consacrées à cette réaction. Mais on s'est aperçu bientôt que l'antigène préparé par ce procédé dévie le complément non seulement avec les sérums lépreux, mais tout aussi bien avec un certain nombre de sérums syphilitiques et d'autres sérums pathologiques. De plus, certains sérums lépreux, surtout ceux provenant d'individus atteints de lèpre nerveuse, donnent des réactions négatives.

De très nombreux travaux sont consacrés aux antigènes préparés avec les divers bacilles acido-résistants. La dernière réaction de ce genre, qui acquit une certaine renommée, est celle de Gomes [3]. Mais les résultats obtenus avec ces antigènes sont

sensiblement les mêmes que pour la réaction d'Eitner ; on constate, d'une part, un manque de spécificité et, d'autre part, un pourcentage plus ou moins élevé des réactions négatives chez les hanséniens.

Les antigènes les plus divers ont aussi été proposés ; on peut citer : le foie des lépreux, les produits d'hérédo-syphilitiques, le cœur du cobaye, le foie normal, la tuberculine, la peau normale, l'extrait alcoolique de sarcome ou de carcinome, les lépromes du rat, la lécithine, le sérum antituberculeux, etc., et cette abondance des réactifs indique bien leur insuffisance.

Les antigènes syphilitiques et tuberculeux donnent souvent des réactions positives avec les sérums des lépreux sans qu'on puisse toujours incriminer d'une façon certaine dans ce cas la syphilis ou la tuberculose.

La plupart des sérums lépreux possèdent donc au point de vue antigénique une structure polyvalente et pour cette raison ils réagissent positivement avec les antigènes les plus divers. Cependant, tous les sérums lépreux ne répondent pas de cette façon et un certain nombre d'entre eux, surtout ceux des malades atteints de la forme nerveuse de la maladie, ne réagissent avec aucun de ces antigènes.

En collaboration avec MM. Marchoux, Macheboeuf et M^{me} Lévy, nous avons démontré, par fractionnement des extraits de lépromes du rat et de l'homme, que les substances actives dans la déviation du complément avec les sérums lépreux appartiennent au groupe des phosphatides apparentés aux phosphatides du bacille tuberculeux [40].

Les réactions de floculation dans la lèpre ont été peu étudiées. Celles de Meinicke, de Kahn et de Witebsky sont parfois positives chez les lépreux. Ces résultats sont d'une interprétation très incertaine. On a signalé aussi que la cuorine floculerait sélectivement avec les sérums syphilitiques et lépreux [43].

La réaction de Rubino occupe une place à part dans la sérologie de la lèpre ; elle consiste dans la sédimentation des globules rouges formolés du mouton et s'apparente à la réaction de Westergreen qui mesure la vitesse de sédimentation des globules rouges non formolés [44]. La réaction de Westergreen, étudiée pour la première fois dans la lèpre par Lie présente un certain intérêt au point de vue du pronostic de la lèpre, et elle est couramment employée par les léprologues aux Indes [7]. Cependant, la réaction de Rubino est d'une spécificité beaucoup plus grande, et elle ne donne des réactions positives qu'exceptionnellement en dehors de la lèpre. Par contre, on peut lui reprocher : 1° un manque de sensibilité, elle n'est positive que dans 50 à 80 p. 100 des cas de lèpre ; et 2° une technique très délicate. Les deux sédimentations sont régies par deux mécanismes différents car on peut épuiser le sérum par les globules rouges non formolés sans

toucher aux « agglutinines » agissant sur les globules formolés.

MM. Marchoux et Caro ont montré que les extraits étherés ou alcooliques des globules rouges formolés du mouton ne flocculent pas spécifiquement avec les sérums lépreux [9]. Ce fait est tout à fait exact pour les réactifs employés par les auteurs. Par contre Rubino, dans une courte note, indique que l'extrait de tissus formolés, préparé avec l'alcool à 90°, floccule avec les sérums lépreux seuls ; les extraits analogues de tissus frais présentant moins de spécificité flocculent, au contraire, avec les sérums syphilitiques, lépreux et même avec certains sérums normaux [12].

Partie expérimentale.

I. — CUORINE.

Avant d'aller plus loin, nous indiquerons que nous avons essayé tout d'abord la cuorine, que nous avons extraite du cœur de cheval par le procédé de Erlandsen [2]. D'après Tsurumi, cette substance flocculerait sélectivement avec les sérums lépreux et syphilitiques [13]. Nos résultats se sont montrés très peu nets ; certains sérums lépreux et syphilitiques flocculent réellement avec la cuorine, mais ils ne flocculent pas tous. En outre, certains sérums, prélevés sur les sujets présumés normaux, présentent une flocculation plus ou moins intense. Il en résulte que ce produit ne possède aucune valeur pratique pour le diagnostic de la lèpre. En plus, signalons deux graves inconvénients des solutions étherées. Premièrement, la difficulté de préparer une émulsion éthérée dans l'eau et, deuxièmement, quand on travaille aux colonies, et nous avons travaillé à Bamako, où la température dans le laboratoire varie de 35° à 40° aux mois d'avril et de mai, la manipulation de l'éther est très difficile et la concentration du corps dissous varie fortement à cause de l'évaporation intense du solvant.

II. — ISOLEMENT D'UN PRINCIPE ACTIF A PARTIR DES GLOBULES ROUGES FORMOLÉS.

L'idée qui nous a guidé dans les expériences que nous allons exposer maintenant est la suivante : les globules rouges formolés se sédimentent en présence de sérums de lépreux plus rapidement que les globules rouges frais, à cause de modifications chimiques provoquées par le formol. Nous avons cherché à isoler le principe actif à partir des globules formolés en préparant toute une série d'extraits de sang formolé, en utilisant comme solvant soit l'éther sulfurique, soit l'acétone, soit l'alcool.

1° *L'extrait acétonique.*

Il s'est montré dénué de toute spécificité pour les sérums lépreux. Les sérums syphilitiques, lépreux ou présumés normaux, flocculent tous dans une même zone ; nous n'avons pas réussi à trouver une zone particulière de flocculation pour les sérums des hanséniens. L'extrait acétonique a été donc rapidement abandonné.

2° *L'extrait éthéré.*

Comme nous l'avons déjà dit pour la solution de cuorine, l'éther présente de grands inconvénients techniques, et, comme il ne possède pas d'avantages particuliers, nous l'avons abandonné rapidement au profit de l'extrait alcoolique.

3° *L'extrait alcoolique.*

A. PRÉPARATION. — L'extrait alcoolique s'est montré le plus intéressant. Voici la technique à laquelle nous nous sommes finalement arrêté :

Le sang de mouton, prélevé à l'abattoir, défibriné et passé sur une compresse de gaze pour retenir les caillots de fibrine, est additionné de 10 p. 100 de formol du commerce à 40 p. 100 ; on agite bien en ajoutant le formol et on abandonne le mélange pendant quarante-huit heures à la température du laboratoire (20°-22° environ). Le sang se gélifie en quelques heures : quarante-huit heures après l'addition du formol, on dissocie la masse coagulée en petits morceaux qu'on lave avec un courant d'eau physiologique pour enlever l'excès d'aldéhyde formique. Pour 2 litres de sang, on laisse passer environ 10 litres d'eau physiologique en vingt-quatre heures. Après lavage, on verse le tout sur un filtre de papier, la masse une fois bien égouttée est mise sur un filtre de Büchner pour l'essorer par le vide le mieux possible. Ensuite, le coagulum, desséché à l'étuve à 37° pendant trois jours puis abandonné pendant deux jours dans le vide sur de la chaux vive, est réduit en poudre.

On ajoute 4 c. c. d'alcool à 90° pour 1 g. de matière sèche. L'extraction est faite à 37° pendant trois jours. L'alcool est séparé par filtration et la poudre est remise dans de l'alcool neuf, cette fois à raison de 2 c. c. pour 1 g. de poudre, c'est-à-dire la moitié de l'alcool pris au début.

Après vingt-quatre heures de séjour à 37° on sépare l'alcool et les deux fractions alcooliques sont réunies. On distille l'alcool à 40°-45°, et le résidu est desséché dans le vide sulfurique. On reprend la substance bien sèche dans une petite quantité d'alcool à 90° et on abandonne à la température de 37° pendant trois jours, puis vingt-quatre heures à la température du laboratoire ; on sépare l'alcool par filtration sur papier, car une partie du dépôt est devenue insoluble dans l'alcool à 90° : c'est une poudre blanche soluble partiellement dans l'eau.

Finalement la concentration de la matière sèche soluble dans l'alcool est ramenée à 3 g. pour 100, avec de l'alcool à 90°.

Pour la préparation de l'extrait alcoolique, il est nécessaire de travailler à la température du laboratoire (20° au minimum) car les substances qui composent cet « antigène » (1) sont peu solubles dans l'alcool froid.

Il est nécessaire de standardiser le pouvoir antigénique d'un extrait nouvellement préparé par rapport à un extrait d'une activité connue pour avoir des résultats comparables, car d'une préparation à l'autre l'antigène présente des variations d'activité parfois considérables.

Pour les réactions, on prépare une suspension aqueuse de cet antigène à 1 p. 10 à l'aide du mélangeur de Vernes : 1 c. c. d'antigène est versé en une minute dans 2 c. c. d'eau bidistillée, la vitesse du mélangeur étant fixée à 200 tours-minute. A la fin de l'opération on ajoute encore 8 c. c. d'eau distillée.

La densité optique mesurée au photomètre de V. B. Y. de l'émulsion diluée :

A 1 p. 40 est égale à 20-22.

A 1 p. 20 est égale à 30-32.

A 1 p. 8 est égale à 89-90.

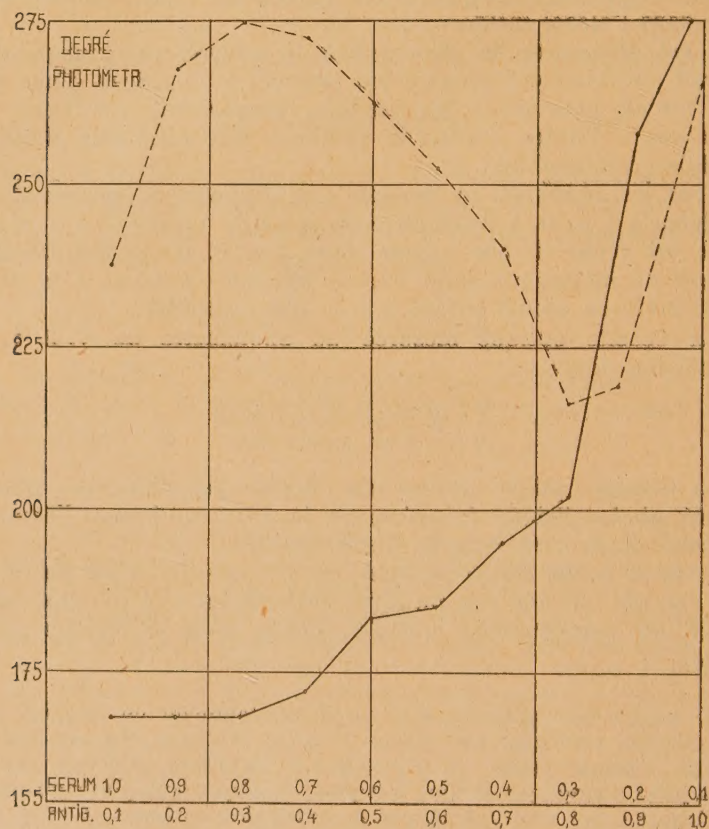
La densité optique propre est calculée par différence entre le degré photométrique trouvé pour la cuve contenant l'émulsion et celui de la cuve remplie d'eau distillée.

Si nous avons choisi ce mode de préparation, c'est parce que les extraits obtenus par un autre procédé se sont montrés moins actifs ou complètement inactifs, comme nous le verrons par la suite.

(1) Le terme « antigène » employé constamment en sérologie pour des réactifs analogues est utilisé dans un mauvais sens au point de vue de l'immunologie. Au point de vue théorique, il serait peut-être plus juste d'employer le mot « haptène ». Cependant plusieurs réactifs sérologiques ne sont même pas de véritables haptènes, comme nous l'avons déjà vu pour la mélanine utilisée dans la réaction de Henry. A ce moment, nous avons comparé la mélanine à un *indicateur*. Il nous semble logique de généraliser ce terme d'*indicateur sérologique*, pour éviter la confusion qui règne au sujet de tous les réactifs sérologiques qui ne sont ni haptènes, ni véritables antigènes et qui, dans certaines conditions, peuvent cependant mettre en évidence un état pathologique particulier du sérum. Parmi ces indicateurs, on peut citer la mélanine dans la réaction de Henry, la résorcine dans la réaction de la tuberculose de Vernes, l'uréastibamine dans la réaction de Brahmachari, le formol dans la formol-gélification, etc. Très probablement ce terme serait applicable aux réactifs utilisés dans la sérologie de la syphilis tels que les antigènes de Kahn, de Meinicke, de Witebsky, le péréthynol de Vernes ou au moins à une partie importante de leurs constituants

B. FLOCCULATION DES SÉRUMS NORMAUX ET LÉPREUX AVEC L'EXTRAIT ALCOOLIQUE DES GLOBULES ROUGES FORMOLÉS. — Ces expériences sont faites avec le sérum chauffé à 55° pendant trente minutes.

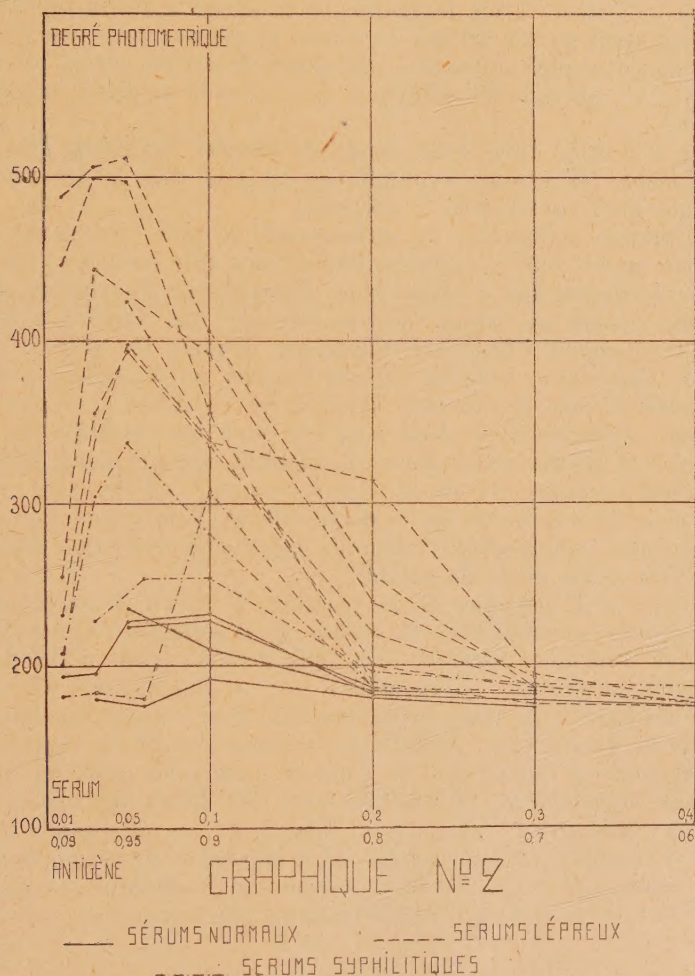
On prépare la suspension d'antigène dans l'eau bidistillée à raison



GRAPHIQUE N° 1
 ——— SÉRUMS NORMAUX
 - - - - - SÉRUMS LÉPREUX

de 1 p. 10. Dans une série de 10 tubes de Vernes, tubes de 5,5 cm. de hauteur et de 1,2 de diamètre on répartit : dans le premier 0,1 c. c. de sérum, dans le deuxième 0,2 c. c., dans le troisième 0,3 c. c., etc., jusqu'à 1 c. c. dans le dixième tube. On affleure dans chaque tube avec la suspension d'antigène à 1,1 c. c. Le premier tube est donc additionné de 1 c. c. de suspension, le deuxième de 0,9, le troisième de 0,8 c. c., le dixième de 0,1 c. c. Après avoir bien mélangé le contenu, on laisse les tubes à la température du laboratoire qui était de 32°.

nos expériences ayant été faites à Bamako, au Soudan français, au mois d'avril-juin 1942. Quatre heures plus tard, le contenu de tous ces tubes est examiné au photomètre de Vernes, Bricq et Yvon. Les résultats pour un sérum lépreux et un sérum normal sont représentés dans le graphique n° 1.



Il en ressort que le sérum lépreux et le sérum normal se comportent différemment avec cet indicateur. Si avec des doses faibles de sérum tous les deux flocculent avec intensité, aux doses plus importantes, le sérum lépreux seul présente une opacification nette. Ce graphique se rapporte à un sérum lépreux très instable. Il est évident qu'il existe parmi les sérums lépreux toute

une gamme de sérums variant des très instables jusqu'à ceux dont le déséquilibre est peu marqué et dont la courbe de floculation se rapproche de plus en plus de celle des sérums normaux.

Pour les sérums lépreux, stables dans cette zone, il est possible de trouver une floculation caractéristique en diminuant le rapport sérum/indicateur. Dans le graphique n° 2 nous avons représenté la floculation de tels sérums en même temps que celle des sérums normaux et syphilitiques avec des doses de sérum variant de 0,01 à 0,4 c. c., après avoir effleuré 1 c. c. avec la suspension d'indicateur.

On voit que dans cette zone les sérums normaux flocculent faiblement, les sérums syphilitiques un peu plus et les sérums lépreux avec encore plus d'intensité.

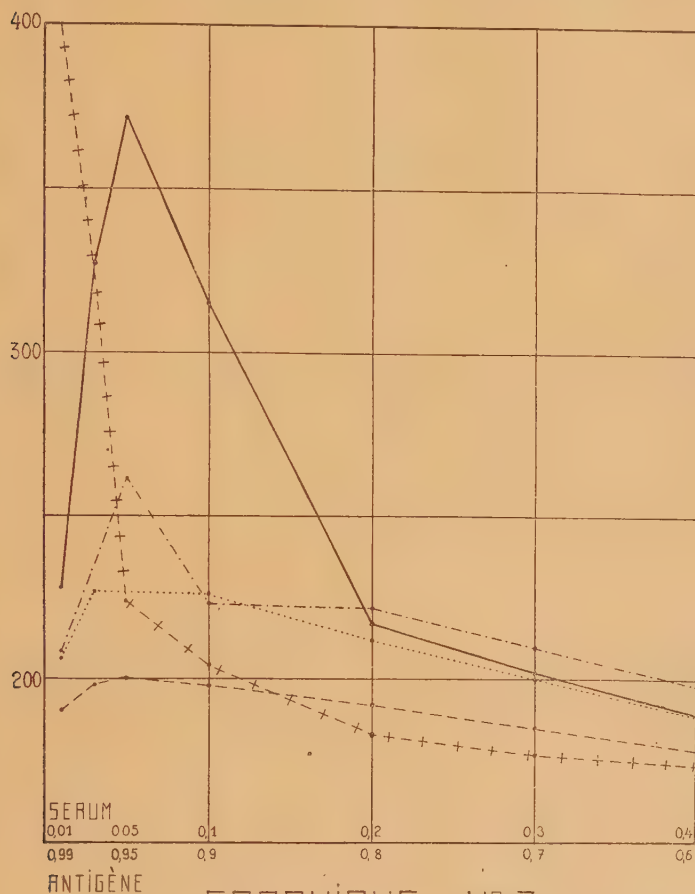
Le premier graphique est certainement le plus intéressant. Les sérums appartenant au groupe des sérums très instables, comme celui représenté sur ce graphique, donnent une floculation particulière, propre au sérum des hanséniens; les sérums syphilitiques répondent, dans ces conditions, comme les sérums normaux. Cependant, tous les sérums lépreux ne répondent pas de la même façon; un certain nombre ne se différencie pas des sérums normaux dans cette zone et pour les identifier il faut chercher à mettre en évidence l'instabilité sérique dans la zone des petites doses de sérum. Mais, comme on le voit, cette deuxième zone présente moins de spécificité, et la distinction entre les sérums syphilitiques et lépreux est moins nette que dans la zone des fortes doses de sérum.

Pour l'étude pratique de la réaction, il fallait déterminer les proportions convenables de sérum et d'antigène. Après avoir examiné tous nos résultats nous nous sommes arrêté d'abord aux rapports suivants : sérum, 0,5 c. c.; « antigène », 0,5 c. c. Pendant longtemps nous avons travaillé avec cette proportion de sérum et d'indicateur. Ensuite nous avons essayé de sensibiliser la réaction en augmentant le rapport « antigène »-sérum. Nous faisons actuellement la réaction avec les doses de sérum suivantes : 0,15 c. c., 0,20 c. c. et 0,50 c. c., ce qui permet d'une part d'identifier un pourcentage plus important de sérum lépreux et, d'autre part, de suivre mieux l'évolution du déséquilibre sérique au cours de la maladie et sous l'action du traitement.

4° Etude de l'extrait alcoolique.

A. RÔLE DE LA FORMOLISATION DES TISSUS SERVANT POUR L'EXTRACTION. — Rubino observe que les extraits de tissus non formolés préparés avec de l'alcool à 90° flocculent non seulement avec les sérums lépreux, mais tout aussi bien avec les sérums syphilitiques et certains sérums normaux. Nous n'avons pu confirmer ces résultats pour les raisons suivantes : quand on prépare l'extrait

alcoolique (alcool à 90°) de sang non formolé de mouton suivant la technique que nous avons indiquée plus haut, la concentration de l'indicateur étant ramenée à 3 p. 100 de matière sèche et les



GRAPHIQUE N° 3

———— EXTRAIT DE TISSUS FORMOLÉS
 - - - - - DE TISSUS NON FORMOLÉS
 ———— + 1% DE FORMOL
 - - - - - ———— + 3%
 + + + + + ———— + 10%

réactions pratiquées suivant le schéma que nous avons utilisé précédemment, on s'aperçoit que cet extrait alcoolique de sang non formolé ne floccule pas du tout avec les sérums, que ce soient des sérums syphilitiques, normaux ou lépreux, aussi bien avec de fortes doses qu'avec de faibles doses de sérum.

Nous avons alors décidé d'ajouter le formol à l'extrait préparé à partir des tissus non formolés. Comme on le voit sur le graphique n° 3, cette addition confère à l'antigène une certaine activité, mais il reste toujours moins actif que l'antigène extrait des tissus formolés.

Nos résultats sont en désaccord avec ceux de Rubino qui observe avec les extraits de tissus non formolés une floculation intense avec la plupart des sérums lépreux, syphilitiques ou normaux. Cette divergence dans les résultats doit s'expliquer par le fait que nous n'avons pas suivi la technique de Rubino ; ainsi, tandis que nous avons utilisé pour l'extraction le sang total, Rubino emploie soit les globules lavés du mouton, soit les organes du lapin ; enfin les méthodes de préparation des extraits ont été très différentes.

B. FORMOLISATION DU SÉRUM. — Nous nous sommes demandé si la réponse serait identique en ajoutant le formol directement dans le sérum au lieu de l'additionner à l'indicateur et en faisant agir ces sérums formolés sur un extrait de tissus non formolés. Le tableau I nous montre que l'addition de formol au sérum lépreux n'intensifie pas la floculation qui reste à peu près la même que celle observée pour le même antigène avec le sérum non formolé.

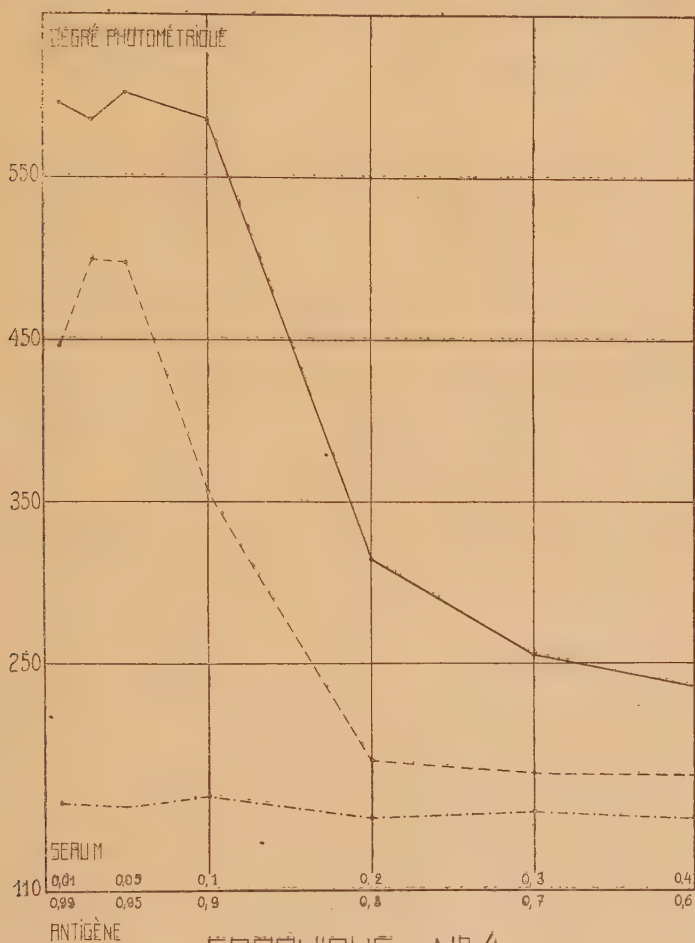
TABLEAU I.

DOSES DU SÉRUM complétées jusqu'à 1 c.c. avec la suspension d'indicateur	SÉRUM formolé à 1 p. 100 antigène extrait des tissus non formolés	SÉRUM non formolé antigène extrait des tissus non formolés témoins	SÉRUM non formolé antigène extrait du tissu formolé préalablement Témoin
0,01	184	190	246
0,03	175	188	226
0,05	174	190	270
0,1	173	187	258
0,2	168	177	195
0,3	167	172	190
0,4	160	168	182
0,5	157	162	177

Les chiffres indiquent la densité optique relevée au photomètre de V. B. Y. des mélanges préparés quatre heures auparavant.

C. INFLUENCE DU DEGRÉ DE L'ALCOOL UTILISÉ POUR L'EXTRACTION. — Partant de sang formolé de mouton, nous avons préparé plusieurs extraits, toujours de la même façon, en nous servant d'alcool éthylique à 70°, 90° et 100°. La concentration des extraits a été toujours fixée à 3 p. 100 de matière sèche. Nous avons établi

les courbes de flocculation comme précédemment, avec les suspensions d'indicateur à 1 p. 10 dans l'eau bidistillée. Le graphique n° 4 représente les résultats pour un sérum lépreux. D'ailleurs



GRAPHIQUE N°4

— — — — —	ANTIGÈNE	A L'ALCOOL	ABSOLU
- - - - -	, , , , ,		A 50°
- . - . -	, , , , ,		A 70°

tous les sérums, lépreux, syphilitiques ou normaux, donnent des courbes analogues qui ne diffèrent que par le niveau du maximum.

On constate que l'intensité de la flocculation croît avec la concentration en alcool. L'extrait préparé avec de l'alcool à 70° ne

flocule avec aucun sérum. L'extrait à l'alcool absolu est plus actif que celui préparé avec de l'alcool à 90°. Cependant, il est moins « spécifique » et de nombreux sérums syphilitiques floclent avec la même intensité que le sérum lépreux, fait probablement dû à la solubilisation par l'alcool absolu du cholestérol si actif dans les réactions de la syphilis. Nous avons donc choisi l'alcool à 90° pour la préparation de notre antigène.

D. INFLUENCE DE LA DISTILLATION. — L'extrait brut de tissus formolés, préparé avec de l'alcool à 90°, floclure très peu avec les sérums lépreux. On fait subir alors à cet extrait une distillation dans le vide sans dépasser la température de 45-50°. Le dépôt, desséché dans le vide, est repris à nouveau dans l'alcool à 90° et la concentration finale est ramenée à 3 p. 100. En faisant les courbes de floculation par la méthode que nous avons déjà indiquée, on constate que l'extrait non distillé ne floclure presque avec aucun sérum ; au contraire, la solution préparée avec le dépôt desséché de la première extraction floclure et donne des réactions typiques avec les sérums lépreux. Ce fait explique les résultats négatifs de MM. Marchoux et Caro qui ont utilisé l'extrait non distillé [9].

A quoi peut être due cette modification ? A la présence du formol libre en excès qu'on élimine par distillation ? Au chauffage de l'antigène ? Ou a une tout autre cause ? Nous avons fait une série d'expériences pour préciser le rôle de ces différents facteurs.

RÔLE DU FORMOL LIBRE. — Nous nous sommes assuré que la présence du formol libre n'influence pas la floculation. L'expérience suivante le prouve. Une demi-heure avant la préparation de la suspension, nous additionnons une partie de notre antigène-indicateur de 1 p. 100 de formol du commerce, une autre partie de 3 p. 100 de formol, la troisième de 5 p. 100 et la quatrième de 10 p. 100 et nous agitons bien. Avec ces 4 fractions formolées et de l'antigène témoin, nous préparons des suspensions à 1 p. 10 dans l'eau bidistillée, de la façon habituelle. Dans le tableau II nous avons donné les résultats obtenus avec un sérum lépreux. Les chiffres indiquent la densité optique des mélanges de sérum et de suspension d'indicateur, déterminée quatre heures après leur préparation.

Il ressort de ceci que la présence d'un excès du formol libre n'atténue pas l'intensité de la floculation et n'explique donc pas les variations qu'on observe avec les extraits distillés et non distillés.

RÔLE DU CHAUFFAGE. — En distillant, on chauffe l'extrait à la température de 45-48°. Pour étudier l'action du chauffage, nous avons porté dans un bain-marie l'extrait non distillé, scellé dans

TABLEAU II.

DOSES DU SÉRUM complétées jusqu'à 1 c. c. avec la suspension indicateur	ANTIGÈNE témoin non additionné du formol	ANTIGÈNE + 1 p. 100 du formol	ANTIGÈNE + 3 p. 100 du formol	ANTIGÈNE + 5 p. 100 du formol	ANTIGÈNE + 10 p. 100 du formol
0,01	363	347	369	359	362
0,03	345	346	389	412	447
0,05	357	346	360	371	352
0,1	417	356	276	283	294
0,2	226	221	217	237	256
0,3	202	206	200	218	235
0,4	196	196	191	203	221

un tube de verre, à la température de 50° pendant deux heures. L'indicateur ainsi traité n'est pas devenu plus actif et il continue à répondre exactement de la même façon que la fraction non chauffée.

Après distillation, le dépôt desséché ne se redissout pas complètement dans l'alcool à 90°. Les substances ont subi une altération considérable. Il est à supposer que c'est cette altération qui est responsable des modifications du comportement de l'antigène après la distillation.

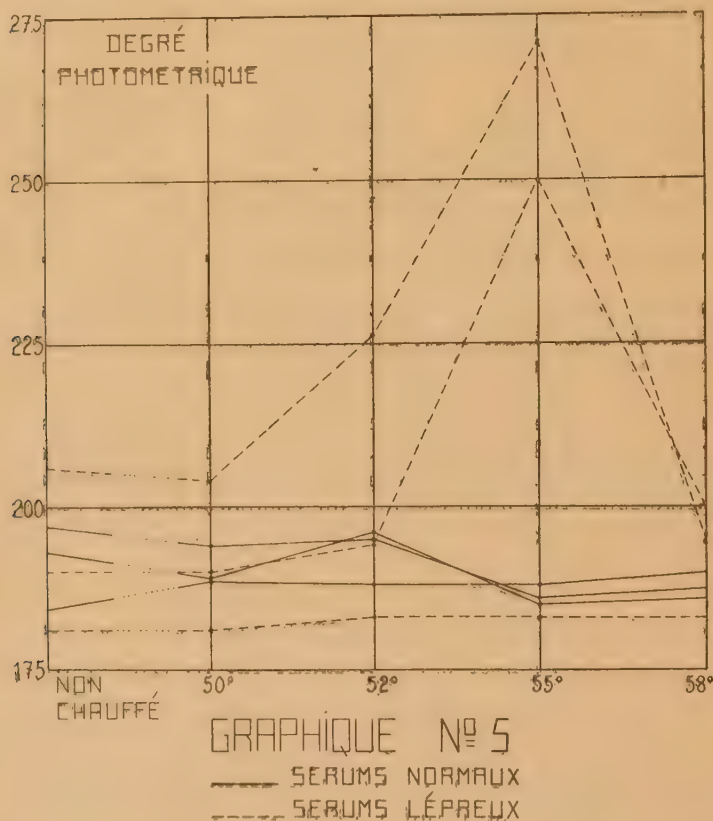
5° Etude de la floculation

de l'extrait alcoolique du sang formolé avec les divers sérums.

Toutes les expériences qui vont suivre ont été faites à Bamako, avec une proportion d'antigène de 0,5 c. c. pour 0,5 c. c. de sérum.

A. CHAUFFAGE DU SÉRUM. — L'antigène est utilisé en suspension à 1 p. 10 dans de l'eau bidistillée. Les réactions sont faites avec sérums non chauffés et chauffés à 50°, 52°, 55° et 58°. Les résultats sont représentés dans le graphique n° 5. Les chiffres indiquent l'opacité des mélanges mesurée au photomètre de V. B. Y., les solutions ayant été préalablement conservées quatre heures à la température de 30°. Nous avons donné les résultats obtenus avec 3 sérums lépreux et 3 sérums présumés normaux. Pour 2 sérums lépreux on constate que le chauffage est nécessaire pour que la floculation puisse se manifester. Le chauffage doit être maintenu exactement à 55°, car des écarts de 3° jouent un rôle très important. Le troisième sérum lépreux, un sérum négatif et les sérums normaux ne sont pas influencés par le chauffage. Il est à noter que dans la réaction au péréthynol de Vernes on observe exactement le même phénomène. La température de 55° paraît vraiment être une température critique pour les sérums;

ces faits sont à rapprocher des mesures de Lecomte du Nouÿ sur la viscosité, la tension superficielle, la solubilité, etc., du sérum. Cet auteur a observé une variation brusque des constantes physico-chimiques quand on chauffe le sérum à 55° et au-dessus (6).



B. CONCENTRATION DE L'ANTIGÈNE. — Nous avons préparé des suspensions d'antigène à diverses concentrations pour voir à quelle concentration on obtient la différence la plus nette entre les sérums lépreux, les sérums normaux et d'autres sérums pathologiques. Trois suspensions ont été utilisées :

- 1° Emulsion A. — 1 c. c. d'antigène pour 2 c. c. d'eau distillée.
- 2° Emulsion B. — 1 c. c. d'antigène pour 10 c. c. d'eau distillée.
- 3° Emulsion C. — 1 c. c. d'antigène pour 14 c. c. d'eau distillée.

Les réactions sont faites à 25°. Pour l'interprétation des résultats, il faut tenir compte du fait suivant : la densité optique des émulsions (la densité optique est la différence entre la densité optique de l'émulsion et celle d'une cuve remplie d'eau distillée,

les mesures étant faites au photomètre de V. B. Y.) intervient dans la lecture des résultats ; elle est égale à 85-87 pour l'émulsion A, à 30-31 pour l'émulsion B et à 20 pour l'émulsion C. La densité optique est déterminée sur les émulsions diluées en parties égales, comme dans la réaction, mais pour ces témoins on utilise de l'eau physiologique au lieu du sérum.

Il faudra donc soustraire des chiffres lus au photomètre pour la réaction, la somme : densité optique de l'émulsion + densité optique du témoin du sérum dans l'eau alcoolisée. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau III.

TABEAU III.

	TÉMOIN avec de l'eau alcoolisée à 1 p. 10	ÉMULSION A		ÉMULSION B		ÉMULSION C	
		Flocculation	Δ	Flocculation	Δ	Flocculation	Δ
Sérums lépreux :							
1	157	267	110	255	98	244	87
2	156			202	46	183	27
3	156	220	64	202	46	183	27
4	156	295	140	295	139	260	104
5	157	255	98	218	61	217	60
Sérums normaux :							
6	156	248	92	178	22	169	13
7	161	227	66	181	20	170	9
8	165	230	65	181	16	174	9
9	158	240	82	188	30	178	20
10	156	226	70	182	26	169	13

Emulsion A, dilution d'antigène à 1 p. 2. — Deux sérums lépreux sur quatre seulement présentent une flocculation quelque peu appréciable ; pour les deux autres sérums lépreux et pour les sérums normaux, la différence entre le tube de réaction et le tube témoin ne dépasse pas ou dépasse de très peu 85-87, densité optique de l'émulsion utilisée.

A cette concentration, l'émulsion est donc trop stable.

Emulsion B, dilution à 1 p. 10. — L'émulsion devient plus labile et tous les sérums lépreux examinés présentent un degré de flocculation au-dessus de 30, chiffre de l'opacité propre de l'émulsion B.

Emulsion C, dilution à 1 p. 14. — Elle donne, avec tous les sérums lépreux examinés, un chiffre au-dessus de 20, densité optique de la suspension C, mais l'intensité de la flocculation est déjà, dans plusieurs cas, plus faible qu'avec l'émulsion B.

Ces résultats nous ont incité à utiliser dorénavant l'antigène en suspension à 1 p. 10.

C. CONSERVATION DE L'ÉMULSION. — La suspension des indicateurs sérologiques dans l'eau est plus ou moins stable ; certains réactifs, comme celui de Meinicke ou de Kahn ne se conservent, une fois émulsionnés dans l'eau, que peu de temps ; les autres, comme le péréthynol, sont utilisables pendant trois heures.

Nous avons étudié combien de temps se conserve la suspension de notre réactif. Pour cela, l'émulsion d'indicateur préparée à 1 p. 10 est partagée en trois parties ; la première nous sert à faire les réactions immédiatement après la fabrication de la suspension, la deuxième quarante-cinq minutes et la troisième trois heures et demie après la préparation. Voici les résultats pour quelques sérums lépreux, la réaction étant pratiquée à 35°. Les chiffres indiquent la différence des degrés photométriques entre le tube de réaction et le tube témoin, contenant le mélange en parties égales du sérum et d'eau alcoolisée à 1 p. 10 (tableau IV).

TABLEAU IV.

SUSPENSION UTILISÉE immédiatement après préparation	SUSPENSION UTILISÉE 45 minutes après préparation	SUSPENSION UTILISÉE 3 h. 1/2 après préparation
39	47	45
54	58	59
46	55	51
45	54	53
204	229	227
150	139	152
29	32	34
40	44	43
46	64	57
30	35	38
32	38	40

Il est donc préférable de n'utiliser la suspension d'antigène qu'une demi-heure au moins après sa préparation, la sensibilité augmentant légèrement pendant ce laps de temps. La suspension conserve ensuite ses propriétés inchangées pendant trois heures au moins.

D. INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE A LAQUELLE SE PRODUIT LA FLOCCULATION. — Au début de nos essais, nous avons été frappé par les résultats inconstants obtenus avec un même sérum dans des réactions pratiquées à quelques heures ou parfois même à quelques minutes d'intervalle. En étudiant les divers facteurs qui influent sur la réaction nous nous sommes aperçu que la température, à laquelle se produit la flocculation joue un rôle très important et c'est uniquement les variations thermiques qui régissent l'intensité de la flocculation, quand toutes les autres conditions

restent constantes. En pratiquant systématiquement notre réaction à des températures différentes, nous avons obtenu les résultats suivants que nous avons résumés dans le tableau V. Les chiffres indiquent la différence entre le degré photométrique du tube de réaction et celui du tube témoin, contenant, comme toujours, le mélange de sérum et d'eau alcoolisés à 1 p. 10 en parties égales.

TABLEAU V.

RÉACTION FAITE à 30°5	RÉACTION FAITE à 35°5	RÉACTION FAITE à 25°	RÉACTION FAITE à 30°
59	54	215	171
51	44	59	48
57	47	52	47
62	58	42	34
64	55	314	302
54	54	36	32
36	38	37	35
251	229	55	43
222	189	45	42
33	37	30	28
33	32	89	78
56	44	68	66
91	64	53	45
35	35	154	125
30	26	37	36

RÉACTION FAITE à 25°	RÉACTION FAITE à 30°	RÉACTION FAITE à 25°	RÉACTION FAITE à 30°
75	65	288	251
37	35	109	71
98	185	64	42
126	79	29	26
57	36	40	33
46	38	127	82
34	32	53	36
65	62	53	43
42	31	154	292
35	33	37	147

A de rares exceptions près, l'intensité de la flocculation baisse donc d'une façon sensible quand on élève la température à laquelle elle se produit.

Pour avoir des résultats comparables, il est nécessaire d'opérer à une température déterminée. Nous avons choisi la température de 25°, car, d'une part, plus la température est élevée, plus la flocculation est faible, d'autre part, la lèpre est une maladie répandue surtout dans les pays chauds où une température au-dessous de 25° est difficile à obtenir sans refroidissement du bain-marie. Nous-même, nous avons été obligé d'ajouter de la

glace au bain-marie pour avoir une température de 25°. Le bain-marie laissé à l'air libre est à 28-34° au mois de mai à Bamako. Il est vrai que le climat de Bamako est très chaud et que nous y avons travaillé dans la période la plus chaude de l'année.

E. CONSERVATION DES SÉRUMS. — Certaines réactions doivent être pratiquées, pour avoir une réponse valable, le jour même de la prise de sang, telle par exemple la réaction à la résorcine de Vernes. D'autres, telles que la réaction de Henry, doivent être pratiquées de préférence vingt-quatre heures après la prise de sang; l'intensité de la réaction baisse rapidement avec le temps de conservation des sérums. La propriété de flocculer avec le péréthynol se conserve plus longtemps (pendant cinq à sept jours), sans faiblir sensiblement. On comprend toute l'importance de cette question pour l'étude sérologique, car il est nécessaire d'obtenir pour une réaction donnée des résultats constants avec un même sérum. Pour des raisons d'ordre technique (nous n'avons pas eu de glacière à notre disposition au début de nos essais),

TABLEAU VI.

SÉRUMS FRAIS Degré photométrique			SÉRUMS CONSERVÉS SANS ANTISEPTIQUES à la température de 30-35° pendant 48 heures Degré photométrique.		
Tubes de réaction	Témoins	Δ	Tubes de réaction	Témoins	Δ
376	461	215	375	466	209
216	457	59	204	457	44
212	460	52	212	461	51
210	461	49	209	459	50
494	455	36	486	456	30
471	457	314	456	457	299
197	460	37	204	457	47
210	455	55	205	457	48
204	456	45	200	456	44
492	461	30	434	462	272
245	456	89	243	463	80
227	459	68	230	458	72
215	462	53	204	464	40
346	456	160	444	457	254
193	456	37	493	454	39
197	462	35	433	461	272
201	464	37	201	467	34

nous avons conservé les sérums à la température du laboratoire, c'est-à-dire à la température de 25°, 30°-35° (Bamako, mois de mai).

La réaction est faite suivant la technique habituelle, lecture au bout de quatre heures. Les résultats sont donnés dans le tableau VI.

A quelques exceptions près, les résultats sont légèrement plus faibles pour les sérums conservés que pour les sérums frais. Remarquons aussi que quelques rares sérums conservés présentent une flocculation beaucoup plus intense que les sérums frais, fait probablement dû à la décomposition du sérum sous l'influence d'une température très propice au développement microbien.

La conservation à la glacière à la température de $+4^{\circ}$ est bien

TABLEAU VII.

	SÉRUMS FRAIS			SÉRUMS CONSERVÉS à la température $+4^{\circ}$ pendant 6 jours		
	Tubes de réaction	Témoins	Δ	Tubes de réaction	Témoins	Δ
1.	214	156	58	214	156	58
2.	206	156	50	206	156	50
3.	297	157	140	290	158	132
4.	304	158	143	300	158	142
5.	198	152	46	198	152	46
6.	186	151	35	185	152	33
7.	223	100	123	221	160	61
8.	206	159	47	206	159	47
9.	261	160	41	211	160	51
10.	357	156	201	349	157	182
11.	236	154	82	236	154	82
12.	261	154	107	261	155	106
13.	221	156	65	220	156	64
14.	199	151	48	198	151	47
15.	279	152	127	279	153	126

préférable, les différences dans la flocculation, dans ces conditions, n'atteignant que quelques degrés photométriques, au maximum, comme l'indiquent les chiffres du tableau VII.

On voit qu'il est possible de conserver les sérums, pour cette réaction, pendant plusieurs jours sans que les résultats varient d'une façon appréciable.

6° Technique de la réaction.

Après toutes nos expériences, nous avons pu fixer la technique de la réaction de la façon suivante :

1° La prise de sang doit être faite de préférence à jeun. Les sérums troubles sont à rejeter. Pratiquer la réaction autant que possible vingt-quatre heures après la prise de sang, mais elle peut être faite sans erreurs considérables avec le sérum conservé à la glacière pendant quatre à cinq jours.

2° Chauffer le sérum, clarifié par centrifugation, à 55° exactement, pendant une demi-heure.

3° Préparer la suspension « d'antigène » à l'aide du mélangeur de Vernes. On verse 1 c. c. d'antigène en une minute dans 2 c. c. d'eau bidistillée, la vitesse du mélangeur étant fixée à 200 tours-minute. Ensuite, sans arrêter le mélangeur, on verse encore 8 c. c. d'eau bidistillée. Dans un tube à part on prépare, pour les témoins, un mélange de 1 c. c. d'alcool à 90° avec 10 c. c. d'eau bidistillée, mélange possédant le même degré alcoolique que la suspension d'antigène.

4° Une demi-heure après la préparation « d'antigène » et après le refroidissement du sérum, on prépare les mélanges de sérum et « d'antigène ». Nous pratiquons parallèlement deux réactions identiques dans trois séries de 4 tubes de Vernes. Dans les 4 tubes de la première série, on met 0,15 de sérum, dans les tubes de la deuxième série, 0,20 c. c. et dans les tubes de la troisième série, 0,50 c. c. Les 2 premiers tubes de chaque série sont complétés, jusqu'à 1 c. c., avec la suspension d'antigène, c'est-à-dire qu'ils sont additionnés de 0,85, 0,80 et 0,50 c. c. de cette suspension. Les 2 tubes restants de chaque série sont complétés jusqu'à 1 c. c. avec de l'eau alcoolisée ; ce sont les tubes témoins. On mélange bien.

5° On porte les tubes au bain-marie à 25° pendant quatre heures.

6° On fait la lecture au photomètre de V. B. Y. Quand on travaille dans un laboratoire trop chauffé ou trop froid, il est utile de ne retirer les tubes du bain-marie qu'au fur et à mesure de la lecture pour ne pas faire subir à la réaction d'importantes variations de température qui pourraient influencer la flocculation.

7° Le résultat de la réaction est obtenu en soustrayant le degré photométrique du tube témoin de celui du tube de réaction.

$$R = \text{Tube avec antigène} - \text{Tube témoin.}$$

(A suivre.)

ACTIONS PRIMAIRES COMPARÉES DES RAYONS X ET ULTRAVIOLETS SUR LA LEVURE *SACCHAROMYCES ELLIPSOIDEUS* (*)

par RAYMOND LATARJET.

I. — INTRODUCTION.

Les rayons ionisants et ultraviolets, agissant sur une cellule, produisent un effet primaire immédiat qui se manifeste à l'échelle moléculaire ou macromoléculaire, encore inaccessible à l'observation directe. Cette première modification de structure d'une certaine zone sensible a pour conséquence tardive la lésion observable. Effet primaire et lésion observable sont reliés par une chaîne de réactions dont le mécanisme nous est inconnu. Or les rayons ionisants et les rayons ultraviolets de l'intervalle 2.000-3.200 Å (domaine d'absorption des protides), qui constituent les deux groupes principaux de radiations douées de propriétés léthales, produisent très souvent des lésions observables si parallèles qu'il est impossible de reconnaître la nature du rayonnement responsable par le seul examen de ces lésions. Une telle similitude s'observe dans l'arrêt de la division cellulaire en ses diverses modalités, la suppression de la virulence, l'inactivation des bactériophages, certaines mutations, etc... Il est alors naturel de penser que ce parallélisme existe également dans la partie sombre de l'évolution qui précède la lésion observable.

Une divergence doit toutefois apparaître quelque part lorsqu'on remonte vers l'effet primaire puisque les mécanismes d'absorption de ces deux groupes de radiations sont différents. On a généralement envisagé jusqu'ici deux effets primaires différents, sans préciser comment leurs conséquences pourraient se rejoindre pour aboutir à la même lésion. Il est plus logique de considérer que l'action initiale du rayonnement consiste, dans les deux cas, à fournir à la zone sensible une énergie suffisante pour produire l'effet primaire. Les processus de libération de cette énergie seraient différents, mais l'effet primaire serait le même. Si l'on admet ainsi que les deux processus convergent au moment où l'énergie minimum nécessaire s'est accumulée, il est probable que

(*) Note présentée à la séance du 7 octobre 1943 de l'Association des Microbiologistes de Langue Française.

cette énergie minimum est la même dans les deux cas. Nous allons voir, par la comparaison expérimentale de ces énergies, que les effets primaires produits par les rayons X et U.V. résultent bien de l'utilisation par la zone sensible de quantités d'énergie comparables.

Pratiquement, le problème peut être abordé de la manière suivante : produisons un phénomène bien défini, par exemple l'arrêt de la multiplication chez une bactérie, au moyen : 1° d'une radiation X, qui procède par ionisation du milieu biologique, c'est-à-dire par libération de grains d'énergie d'environ 33,5 électron-volts ; 2° une radiation U.V., λ 2537 Å par exemple, qui procède par libération directe de l'énergie totale du photon absorbé, soit 5 électron-volts, énergie insuffisante pour ioniser le milieu. Irradiations avec chacune d'elles deux lots d'une même population et déterminons les deux courbes de lésion qui relient le taux des lésions à la dose. Les dessins de ces courbes nous donnent les nombres n et n' de « chocs » — c'est-à-dire n ionisations, pour la courbe X, et n' photons absorbés pour la courbe U.V. — qui doivent se produire efficacement dans le volume sensible pour entraîner la lésion primaire. Ils nous donnent également en électron-volts des énergies $w = 33,5 n$ et $w' = 5 n'$ suffisantes pour entraîner cette lésion. Il suffit alors de comparer ces deux valeurs (1).

Avant d'utiliser dans ce but les courbes de lésions obtenues par divers auteurs, au moyen de techniques diverses, il convenait d'effectuer des expériences dans des conditions strictement superposables.

L'irradiation du bacille paratyphérique Y m'a donné un premier résultat édifiant [7]. L'effet primaire entraînant l'arrêt de la multiplication est consécutif :

(1) $w = 33,5 n$ est une énergie suffisante. L'énergie nécessaire W , qui nous intéresse, est comprise entre cette valeur et celle qui correspond à un choc de moins, soit $33,5 (n-1)$.

Il vient donc :

$$33,5 n \geq W > 33,5 (n-1).$$

De même, en U.V. :

$$5 n' \geq W' > 5 (n'-1).$$

Si $W = W'$, l'ensemble de ces deux inégalités devient :

$$kn \geq n' > k(n-1) \quad (1)$$

k étant le rapport des énergies des deux chocs (dans l'exemple choisi, $k = \frac{33,5}{5} = 6,7$). Du point de vue expérimental, rechercher si $W = W'$ revient à examiner si les valeurs n et n' fournies par l'expérience satisfont à l'inégalité (1).

En rayons X (0, 71 Å), à une seule ionisation, soit une énergie W inférieure ou égale à 35,5 e. V.

En rayons U. V. (2537 Å), à 6 photons absorbés, soit une énergie W' comprise entre 25 et 30 e. V.

Pour contrôler l'égalité éventuelle de ces deux valeurs de l'énergie, il était alors indiqué de s'adresser à une cellule chez laquelle l'effet primaire exige plusieurs ionisations. Le nombre des photons U.V. nécessaires serait-il alors proportionnellement accru ?

La levure irradiée à l'état de repos peut répondre à cette question car, selon de nombreux auteurs [1, 2, 4, 9, 11, 12], l'arrêt de sa division exige plusieurs ionisations ou un nombre élevé de photons U.V. (2).

II. — TECHNIQUE EXPÉRIMENTALE.

Deux sources monochromatiques puissantes ont été utilisées :

a) Une anticathode de cuivre sous 33 kilovolts, dont le rayonnement X est filtré de manière à donner presque exclusivement la raie $K\alpha$ de ce métal ($\lambda = 1,54$ Å). L'intensité du rayonnement au niveau de la préparation est fixée à 3.000 r par minute pour les faibles doses, et à 12.000 r par minute pour les fortes doses (dosage effectué au moyen d'une chambre étalonnée par M. Frilley).

b) Une lampe à vapeur de mercure à basse pression donnant presque exclusivement la raie 2.537 Å dont l'intensité au niveau de la préparation est fixée à 26 ergs par millimètre carré par seconde.

Les poses ne dépassent jamais deux minutes.

La levure, *Saccharomyces ellipsoideus*, variété Chambertin, entretenue depuis trois mois sur gélose peptonée sucrée, est prélevée après cinq jours de culture à 25°, puis mise en suspension, à une concentration convenable, dans l'eau physiologique. La suspension est filtrée à cinq reprises sur coton comprimé, de manière à éliminer les amas, puis versée en excès sur la gélose d'une grande boîte de Petri que l'on égoutte après un contact de quelques secondes. Cette boîte est ensuite irradiée à travers un couvercle de plomb percé d'une ouverture circulaire de 1 cm. de diamètre permettant de soumettre successivement à des doses croissantes une dizaine de plages de la même préparation. D'autres plages non irradiées servent de témoin. La boîte est ensuite portée à l'étuve à 25°. Le milieu nutritif utilisé est peu favorable à un développement rapide des colonies. Les premières divisions appa-

(2) Deux de ces travaux ont déjà comparé les deux rayonnements [4, 12], mais leurs résultats ne peuvent répondre à la question posée. En effet, les courbes données par Wyckoff et Luyet sont, de l'avis même des auteurs, insuffisamment précises pour donner les nombres exacts de chocs n et n' . Quant aux expériences de Holweck et Lacassagne, elles utilisaient un rayonnement U.V. de grande longueur d'onde (3.000-4.000) dont l'action létale ne se manifeste pas comme celle des radiations ionisantes (absence de mort différée notamment).

raissent après quelques heures et il faut attendre vingt heures d'incubation à 25° pour que les colonies soient bien constituées. On est ainsi assuré qu'aucune division ne se produit pendant les quelques minutes qui s'écoulent entre l'ensemencement de la boîte et la fin de l'irradiation, condition expérimentale évidemment nécessaire (3).

Observation des lésions et numération. — Les préparations examinées au microscope après vingt heures d'incubation présentent les diverses lésions décrites par Lacassagne après irradiation par les rayons X [6]. A côté des colonies normales provenant d'éléments non lésés, on distingue : a) des colonies anormales issues de sujets touchés mais non affectés dans leur pouvoir de division ; b) les diverses figures de l'arrêt de la division (mort différée), constituées par de grosses cellules qui ont pu, avant l'arrêt, se diviser un certain nombre de fois (chaînettes), une seule fois (doubles) ou pas du tout (simples) ; c) les cellules tuées aussitôt (mort immédiate) identiques aux cellules initiales.

Ces lésions sont les mêmes après irradiation par les rayons X ou U.V., au point qu'il est impossible de distinguer les unes des autres les boîtes des deux séries.

En prolongeant l'incubation et en suivant au microscope l'évolution de ces figures, on est frappé par l'aptitude de la levure à réparer ses lésions, phénomène souligné par Holweck et Lacassagne [5], et mis en lumière par le séjour de la préparation à la glacière [8]. Ainsi, par exemple, tel double ou chaînette, dont la division a été manifestement interrompue, peut parfois se diviser à nouveau, donnant des cellules qui recouvrent peu à peu l'aspect de la levure normale, en sorte qu'après quelque temps on ne distingue plus les gros éléments initiaux noyés dans la masse des cellules filles d'apparence normale. Examinée de bonne heure, cette figure signe un élément lésé ; vingt-quatre heures plus tard, la colonie est considérée à tort comme issue d'une levure non atteinte. Ainsi, ces réparations, dont le nombre est imprévisible, modifient le taux des lésions et l'allure de la courbe de lésion. Elles contribuent à expliquer les différences que l'on relève entre les courbes proposées par les divers auteurs. Pour se prémunir contre elles, il est avantageux de faire des numérations précoces au microscope plutôt que de dénombrer ultérieurement des colonies visibles à l'œil nu. On obtient de cette manière le nombre total *exact* des individus irradiés et l'on élève encore la précision en opérant sur une population dense, tout en évitant les confluences de colonies.

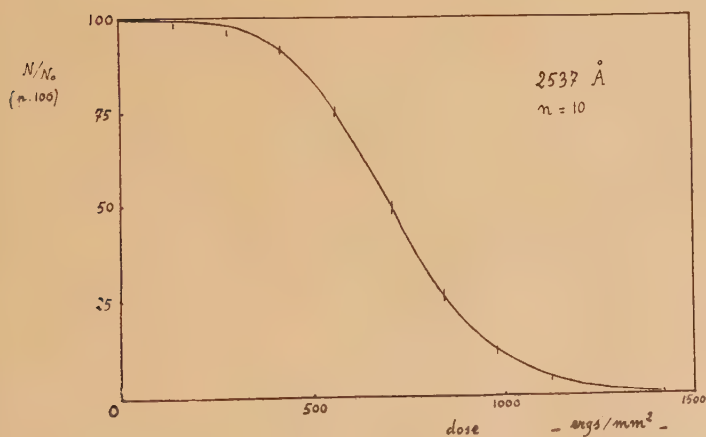
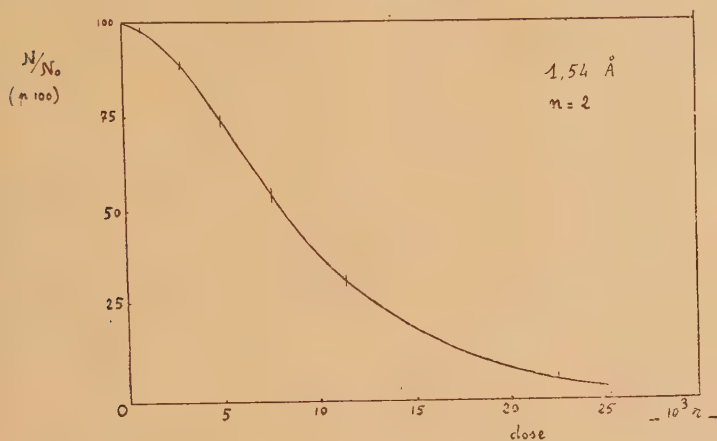
On s'est assuré de l'absence de toute figure anormale dans les zones témoin non irradiées, condition qui n'a été obtenue qu'après un certain nombre de repiquages sur le même milieu.

Sept expériences furent pratiquées qui donnèrent des résultats concordants. Au total, 10.000 figures furent dénombrées à la vingtième heure, par deux opérateurs, et les figures anormales furent classées, d'après le nombre de leurs cellules, en

simples,
doubles,
chaînettes de 3, 4, 5, 6, 7, 8 et 9 cellules,
colonies anormales de 10 à 20, 20 à 30, 30 à 40, 40 à 50, 50 cellules et plus.

(3) L'irradiation d'une culture en état de croissance active fait interférer deux phénomènes différents et conduit à des résultats dont l'interprétation est d'une extrême complexité [Cf. 3, 10].

Chaque fois ces numérations furent reprises après quarante et soixante heures, ce qui permet de suivre les phénomènes de réparation et le destin de chaque figure. Cet examen critique me conduisit à choisir pour test d'action l'arrêt de la division, c'est-à-dire la mort différée (M.D.), à la vingtième heure ; et pour meilleure représentation de ce phénomène : les chaînettes de moins de 10 cellules, les doubles



Irradiations X et U. V. de la levure *S. ellipsoideus*. Trait plein, courbes théoriques de lésion pour $n=2$ et $n=10$; traits verticaux, résultats expérimentaux avec déviation standard. Courbe supérieure : irradiation X; courbe inférieure : irradiation U. V.

et, *a fortiori*, les simples. Ce choix comporte une certaine part d'arbitraire. Mais il en fallait un, et comme il fut le même dans les deux cas, la comparaison des deux séries d'expériences conserve sa valeur.

Sur chaque plage on détermina alors le nombre N des sujets non

TABLEAU I. — Variation de N/No en fonction de la dose (moyennes des résultats; 2σ écart standard).

RAYONS X (1,54 Å)			RAYONS U. V. (2.537 Å)		
Dose (r)	N/No (p. 100)	2 σ (p. 100)	Dose (ergs/mm²)	N/No (p. 100)	2 σ (p. 100)
1.000	97	1,22	140	99	0,68
3.000	87	1,88	280	97	1,46
5.000	72	2,14	420	90	2,36
7.500	53	3,42	560	75	3,46
11.250	31	2,26	700	50	4
22.500	6	1,68	840	27	3,52
			980	11	2,60
			1.120	4	1,48
			1.400	0,5	0,56

lésés et le nombre total No des sujets irradiés et l'on construit la courbe donnant, en fonction de la dose, le taux N/No des sujets non lésés.

III. — RÉSULTATS CONCERNANT L'ÉNERGIE.

Le tableau I et la figure 1 groupent la moyenne des résultats fournis par les 7 expériences ainsi que l'écart standard 2σ qui se rapporte à chaque valeur du taux N/No. En rayons X, les résultats se placent sur la courbe théorique correspondant à 2 choes. En rayons U. V., ils correspondent de manière satisfaisante à la courbe théorique à 10 choes. Dans les conditions précitées, l'arrêt de la division est donc consécutif, soit à $n = 2$ ionisations, soit à $n' = 10$ photons. L'énergie nécessaire à la production de l'effet primaire est :

En rayons X, comprise entre 33,5 et 67 e. volts.

En rayons U. V., comprise entre 45 et 50 e. volts,

ces intervalles sont compatibles avec une même valeur de cette énergie.

IV. — RÉSULTATS CONCERNANT LE VOLUME SENSIBLE ET LA PROBABILITÉ D'ACTION.

Les courbes de lésion permettent de mesurer le volume sensible, c'est-à-dire, en l'occurrence, le centre directeur de la multiplication cellulaire. Considérons pour cela la levure étudiée comme un ellipsoïde de révolution ayant pour grand axe $2b = 8\mu$ et pour petits axes $2a = 5\mu$, soit pour volume $105\mu^3$. La levure, qui peut prendre toutes les positions par rapport à la direction des rayons, offre à ceux-ci une épaisseur moyenne :

$$r = \frac{4}{3} \sqrt{a^2 b} = 3,8\mu \quad (\text{formule classique de Glocker})$$

et une section moyenne :

$$S = \frac{ab}{2e} \left(K \times \frac{\sin 2K}{2} \right) = 28 \mu^2 \quad [\text{formule non publiée de R. Daudel}] (4).$$

En conduisant les calculs comme je l'ai déjà fait pour le bacille paradysentérique Y [6], on aboutit aux résultats suivants :

1° *Rayons X*. — La dose qui produit en moyenne un choc efficace par levure est égale à 4.750 r, soit $7,6 \cdot 10^{15}$ ionisations par centimètre cube (800.000 par levure). Le volume sensible apparent est donc :

$$v_1 = \frac{4}{7,6} 10^{-15} = 4,32 \cdot 10^{-16} \text{ cm}^3.$$

soit, en supposant ce volume sphérique, un diamètre (5) :

$$d_1 = 63 \text{ m}\mu$$

(chez le bacille Y, $d_1 = 60 \text{ m}\mu$).

Par suite de l'indétermination qui subsiste sur la probabilité d'action p de l'ionisation, ces valeurs ne représentent que des limites inférieures des valeurs vraies :

$$V = v_1/p \text{ et } d = d_1/\sqrt[3]{p} \text{ (Cf. [7])}.$$

Mais comme p est probablement le même ici que pour le bacille Y, les dimensions vraies doivent être également les mêmes pour ces deux cellules.

2° *Rayons U.V.* — La dose incidente correspondant en moyenne à un choc efficace par levure est égale à 71 ergs par millimètre carré, soit $9,2 \cdot 10^{12}$ photons par millimètre carré, soit encore $26 \cdot 10^7$ photons par levure. D'après Gates, une épaisseur de $3,8 \mu$ absorbe environ 75 p. 100 de la radiation 2.537 Å. Un choc efficace correspond ainsi à l'absorption de :

$$26 \cdot 10^7 \times 0,75 = 19,5 \cdot 10^7 \text{ photons.}$$

Le volume sensible apparent est donc :

$$v_2 = \frac{105 \cdot 10^{-12} \text{ (vol. de la levure)}}{19,5 \cdot 10^7} = 5,4 \cdot 10^{-19} \text{ cm}^3.$$

(pour le bacille Y, $6,2 \cdot 10^{-19}$).

Soit p_x et p_{uv} les probabilités d'action de l'ionisation et du photon.

(4) Dans cette formule, e est l'excentricité

$$\sqrt{1 - \left(\frac{a}{b}\right)^2} \quad \text{et} \quad K = \arcsin e.$$

(5) Holweck et Lacassagne ont donné antérieurement un diamètre de $100 \text{ m}\mu$ [5].

Il vient :

$$V = v_1/p_x = v_2/p_{ur}$$

d'où :

$$p_x/p_{ur} = v_1/v_2 = 2/4.$$

La probabilité d'action de l'ionisation est ici deux cent quarante-quatre fois plus grande que celle du photon [pour le bacille Y : $p = 215$] (6).

V. — CONCLUSIONS.

1° La mesure des énergies nécessaires pour produire, avec les rayons X et U.V., l'arrêt de la multiplication chez la levure *S. ellipsoideus*, a fourni des valeurs comparables. Ce résultat confirme celui qui fut obtenu sur le bacille paratyphérique Y : il s'inscrit en faveur de l'hypothèse que j'ai envisagée au début de ce travail, et que je puis formuler maintenant avec plus de poids, comme suit :

a) Quand les rayons ionisants et les rayons U.V. produisent la même lésion, celle-ci serait, dans les deux cas, consécutive au même effet primaire. Pour subir cet effet, la même zone cellulaire sensible utiliserait la même quantité d'énergie. Inversement, si l'on fournit à la même zone cellulaire, sous forme de rayons ionisants et de rayons U.V., des énergies telles que l'énergie *efficacement utilisée*, soit la même dans les deux cas, on doit déterminer le même effet. Ainsi, les énergies individuelles de plusieurs photons U.V., ou leurs conséquences immédiates, pourraient être additionnées par la zone sensible pour aboutir au même résultat que l'énergie de l'ionisation. Cette aptitude de sommation est susceptible d'éclairer la nature inconnue de l'effet primaire.

b) Quand les deux groupes de radiations produisent des lésions différentes, cette divergence devrait être attribuée non pas à des mécanismes d'action biologique différents, comme on l'a cru jusqu'ici, mais à des distributions différentes de l'énergie absorbée par la cellule. L'absorption moléculaire des radiations U.V. est, en effet, hautement sélective, contrairement à l'absorption atomique des radiations ionisantes.

2° L'énergie relativement faible du photon U.V. absorbé a moins de chances d'être efficacement utilisée que l'énergie plus grande de l'ionisation. Sa « probabilité d'action » est moindre. Si donc on veut comparer les actions des deux rayonnements, il faut procéder non pas à « énergies absorbées » égales, mais à « énergies utilisées » égales. Dans les circonstances expérimentales précédentes cette égalité est obtenue au prix d'une

(6) Ces valeurs de p dépendent du coefficient d'absorption de la cellule vis-à-vis de la radiation 2.537 Å, dont la mesure, très délicate, comporte encore une certaine indétermination.

énergie U. V. absorbée deux cent quarante fois plus grande, environ, que l'énergie X absorbée.

3° L'irradiation permet de calculer la limite inférieure du volume sensible, c'est-à-dire, en principe, du domaine cellulaire que le rayonnement doit frapper pour arrêter la multiplication de la cellule, sans préjuger en rien de sa forme ni de sa localisation. On a trouvé pour cette limite $1,32 \cdot 10^{-16} \text{ cm}^3$ (ce qui, dans le cas d'une sphère, correspond à un diamètre de $63 \text{ m}\mu$).

La courbe spectrale d'efficacité des diverses radiations U.V. (Gates, Oster, Caspersson) montre que cette zone sensible est probablement de nature nucléoprotéidique. La production de l'effet primaire par un nombre réduit de chocs fait présager, en outre, d'un nombre restreint de molécules. On peut ainsi penser qu'il s'agit d'une formation nucléaire constituée par quelques grosses molécules nucléoprotéidiques. Petite fraction du noyau, elle en représente vraisemblablement la partie active vis-à-vis de la multiplication.

Si l'on compare les mesures effectuées sur la levure et sur le bacille Y, on constate que cet édifice nucléaire a les mêmes dimensions chez ces deux cellules dont les volumes totaux sont pourtant dans le rapport de 1 à 200.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BONÉT-MAURY (P.) et HUSSON (A.). *C. R. Soc. Biol.*, 1942, **136**, 475.
- [2] GLOCKER (R.), LANGENDORFF (H.) et REUSS (A.). *Strahlenth.*, 1933, **46**, 517.
- [3] HENSHAW (R. S.) et TURKOWITZ (H.). *Am. J. Röntgenol.*, 1940, **43**, 93.
- [4] HOLWECK (F.) et LACASSAGNE (A.). *C. R. Acad. Sci.*, 1930, **190**, 524.
- [5] HOLWECK (F.) et LACASSAGNE (A.). *C. R. Soc. Biol.*, 1931, **107**, 814.
- [6] LACASSAGNE (A.). *Radiophysiol. et Radioth.*, 1934, **3**, 81.
- [7] LATARJET (R.). *Ces Annales*, 1943, **69**, 205.
- [8] LATARJET (R.). *C. R. Acad. Sci.*, séance du 9 août 1943.
- [9] OSTER (R. H.). *J. gen. Physiol.*, 1935, **18**, 71.
- [10] REBOUL (J. A.). *Cahiers de Physique*, 1942, n° 11, 63.
- [11] SCHREIBER (H.). *Strahlenth.*, 1934, **49**, 541.
- [12] WYCKOFF (R. W.) et LUYET (B. J.). *Radiology*, 1931, **17**, 1171.

CARACTÈRES TOXIQUES ET ANTIGÉNIQUES DES EXTRAITS TRICHLORACÉTIQUES DES SOUCHES D'*AEROBACTER* D'ORIGINE INTESTINALE (*)

par R. PIROT, M. BOURGAIN et J. DUFAU-CASANABE.

(Laboratoire de Bactériologie
de l'Arrondissement maritime de Toulon.)

Boivin et ses collaborateurs ont récemment attiré l'attention sur l'importance et la multiplicité des types antigéniques (antigène O glucido-lipidique) chez les colibacilles de la flore intestinale de l'homme normal. Or, la flore colibacillaire (*sensu stricto*) ne représente qu'une faible partie des germes que l'on peut identifier couramment dans les fèces humaines.

C'est ainsi que, pour nous en tenir à la seule flore aérobie bacillaire Gram négative, sur 84 selles systématiquement examinées à Toulon chez des sujets non diarrhéiques ni dysentériques, nous trouvons après isolement et identification : 11 souches d'*Aerobacter* (*A. lactis aerogenes*, 8 ; *A. cloacae*, 3), pour 98 *Escherichia*, 10 *Alcaligenes*, 2 *Eberthella* (dont 1 typhosa), 4 *Salmonella*, 3 *Shigella*, 3 *Proteus*.

Les germes dénommés ici *Aerobacter* ont été identifiés d'après les caractères suivants :

<i>Escherichia</i>	<i>Aerobacter</i>	<i>Klebsiella</i>
Fermentations sucrées comparables d'un genre à l'autre.		
Virage du rouge neutre avec fluorescence et dégagement gazeux en milieux lactosés.	Virage du rouge neutre avec fluorescence et dégagement gazeux en milieux lactosés.	Virage du rouge neutre avec fluorescence et dégagement gazeux en milieux lactosés.
Indol = +.	Indol = variable.	Indol = 0.
Acétyl-méthyl-carbinol = 0.	Acétyl-méthyl-carbinol = +.	Acétyl-méthyl-carbinol = +.
Test de Koser : variable.	Test de Koser = +, constant.	Test de Koser = 0.

La fréquence relative et l'abondance des *Aerobacter* ont retenu notre attention, et, nous inspirant des travaux de Boivin, nous avons cherché à mettre en évidence dans ces souches la présence d'un antigène glucido-lipidique. L'extraction par l'acide trichloracétique, selon la technique de cet auteur a fourni, pour toutes

(*) Note présentée à la séance du 4 novembre 1943 de l'Association des Microbiologistes de Langue Française.

les souches examinées à cet effet, un complexe glucido-lipidique, renfermant de 40 à 50 p. 100 de sucre exprimé en glucose, hautement toxique pour la souris par voie intrapéritonéale à faible dose ; ce complexe, comme nous le verrons plus loin, s'est montré doué du pouvoir antigénique même à faible dose ; nous le désignons ici sous l'abréviation A.G.L.

La rareté des souris blanches, la difficulté de leur approvisionnement dans la région et le fait que nous avons à notre disposition un élevage florissant de rats, nous ont fait préférer ce dernier animal pour les épreuves de toxicité et d'immunité de l'A.G.L. Nous y trouvons en outre l'avantage de manipulations plus simples, d'animaux très peu sensibles aux infections intercurrentes ; aucune épizootie ne sévit depuis quatre ans sur cet élevage ; nous ne constatons pratiquement jamais, en cours d'expérimentation, de morts « accidentelles ».

Nos recherches sur la toxicité de l'A.G.L. ont porté jusqu'à présent sur 11 souches d'*Aerobacter* isolées. Les conditions d'extraction de l'antigène, dans notre mode opératoire, copié sur celui indiqué par Boivin, est tel que 1 c. c. du produit final correspond à 25 mg. de corps bactériens.

Des essais préliminaires nous ont montré la sensibilité exagérée des jeunes rats (comparable à celle de la souris), et au contraire la régularité des effets toxiques enregistrés sur les rats adultes. Il convient d'utiliser exclusivement des rats d'un poids moyen de 120 à 150 g.

Toutes les injections destinées à mesurer la toxicité ont été pratiquées par voie intrapéritonéale. Le plus souvent la mort survient chez les rats soit en quelques heures — parfois au bout de trois heures — soit dans les deux premiers jours. Il est exceptionnel de constater la mort au bout de cinq ou au bout de huit jours (une constatation de chaque ordre, une fois, sur plus de 100 rats injectés).

La symptomatologie grossière est assez facile à suivre, et dans les séries de rats inoculés il est possible de reconnaître de bonne heure les animaux voués à la mort : immobilité, réactivité très faible, l'animal se laisse coucher sur le flanc et demeure dans cette position.

Pour des rats de poids voisin (120 à 150 g.), les délais de mortalité sont assez réguliers et inverses de la dose injectée. Voici deux exemples de titrage (V. tableau I).

La voie sous-cutanée, que nous avons essayée, entraîne habituellement la mort aux mêmes doses ou à des doses très légèrement inférieures, mais l'issue fatale survient dans les délais toujours plus longs en relation évidente avec l'absorption moins rapide. Cette inoculation par voie sous-cutanée ne nous a pas retenus ; elle ne présente aucun avantage chez le rat.

TABLEAU I.

	NUMÉRO des rats	DOSES d'antigène injectées en c.c.		MORT au bout de
Souche Le Guen.	189	0,5	+	16 heures.
	190	1	+	8 heures.
	191	1,5	+	5 heures.
Souche Le Meur.	195	0,5	0	Survit.
	196	1	+	18 heures.
	197	1,5	+	16 heures.
Une croix (+) indique la mort; 0, signifie que l'animal a résisté.				

RÉSULTATS. — 1° *Toxicité* : sur 11 souches d'*Aerobacter* isolées de fèces humaines chez des sujets ni diarrhéiques, ni dysentériques au cours de l'année 1942 et entretenues par repiquages peu fréquents (tous les deux mois), nous avons trouvé :

4 souches très toxiques, D.m.m. d'A.G.L. inférieure ou égale à 0,2 c. c. (chez le rat adulte) ;

6 souches toxiques, D.m.m. d'A.G.L. égale à 0,5 ou 1 c. c. (rat adulte) ;

1 souche faiblement toxique, D.m.m. d'A.G.L. égale à 2 c. c. (chez le rat adulte).

Les souches les plus toxiques, injectées par voie intrapéritonéale à la dose de 0,2 c. c. d'A.G.L., entraînent la mort dans des délais très rapides :

SOUCHES	DOSE D'A. G. L. en c. c.	MORT EN
15-I	0,2	5 heures.
77-I	0,2	10 heures.
31-I	0,2	3 heures.

2° *Pouvoir antigénique* : ayant déterminé les doses mortelles d'A.G.L. sur des séries de rats injectés par voie intrapéritonéale, chacun avec une seule dose (croissante dans la série de rats considérée), nous avons, dans un délai de vingt jours, réinjecté une dose sûrement mortelle à ceux des rats qui avaient résisté aux inoculations de la dose juste infra-mortelle. Cette épreuve, sévère, puisque le rat n'est préparé que par une seule injection, s'est montrée favorable huit fois sur dix. Voici quelques exemples de ces essais d'immunité homologue (V. tableau II).

Dans ce dernier cas, l'immunité n'est pas acquise ; cependant la résistance de l'animal est accrue : il meurt après quatre jours pleins pour une dose de 1 c. c. qui tuait le rat non préparé en dix-huit heures.

TABLEAU II.

SOUCHES	NUMÉRO des rats	DOSE d'antigène injectée en c.c.	RÉSULTAT de l'inoculation	REINOCULATION Epreuve au jour 21 avec	RÉSULTAT
76-I. . . . }	160	0,5	0, survit.	1 c.c.	0, survit.
	161	1	+ en 12 h.		
	162	1,5	+ en 10 h.		
	(le rat 160 a acquis l'immunité).				
Col. III . . }	166	0,5	0, survit.	1 c.c.	0, survit.
	167	1	+ en 18 h.		
	168	1,5	+ en 7 h.		
	(le rat 166 a acquis l'immunité).				
Col. IV . . }	195	0,5	0, survit.	1 c.c.	+ au 5 ^e j.
	196	1	+ en 18 h.		
	197	1,5	+ en 17 h.		
	(le rat 195 n'a pas acquis l'immunité).				
Une croix (+) indique la mort; 0, signifie que l'animal a résisté.					

Dans une autre série d'expériences, l'immunité croisée obtenue par l'injection d'A.G.L. d'une souche déterminée d'*Aerobacter*, à l'égard d'autres souches de la même espèce microbienne, a été recherchée après 2 injections à vingt jours d'intervalle de l'antigène immunisant. La dose d'épreuve (mortelle et vérifiée sur un témoin dans chaque essai en cours) de l'antigène d'une autre souche d'*Aerobacter* était inoculée de trente à trente-six jours en moyenne après la deuxième injection. Sur des rats de 120 à 150 g. l'immunité croisée s'est toujours montrée rigoureuse dans ces conditions sévères de courte préparation. Elle n'était par contre pas toujours acquise sur des rats de poids égal ou inférieur à 70 g., injectés avec la D.m.m. des rats de 120-150 g.

Voici deux exemples d'immunité croisée acquise et un résultat (tableau III).

TABLEAU III.

SOUCHES utilisées (D. m. m., 1 c.c.)	NUMÉRO des rats	POIDS en grammes	INJECTION D'ANTIGÈNE en centimètre cube		INOCULATION d'épreuve au jour 21 + 36 avec 0,5 c.c. (dose mortelle) de la souche 15-I
			au jour 1	au jour 21	
Col. III. . .	166	125	0,5	1	0, survit.
76-I.	160	150	0,5	1	0, survit.
76-I.	157	70	0,1	0,2	+ en 16 heures.
Une croix (+) indique la mort; 0, signifie que l'animal a résisté.					

La mise en évidence de l'antigène O complet dans les souches d'*Aerobacter* pose d'intéressants problèmes concernant les rapports antigéniques entre ces germes et les espèces, bactériologiquement voisines, Gram négatives de la flore intestinale. Nous n'avons pas abordé, dans cette étude préliminaire, l'analyse antigénique de nos souches, mais nous retenons comme premiers points, d'une part leur caractère fortement toxique, et d'autre part la parenté immunologique qui les relie les unes aux autres.

D'un point de vue général, à considérer le volume microbien considérable des espèces prédominantes de la flore au niveau du côlon (Colibacille, *Aerobacter*), on est surpris par le potentiel latent d'ordre endotoxique (somatique) que représentent ces germes dans la dernière portion du tractus digestif. S'il était admis jusqu'à présent que les produits solubles microbiens sécrétés jouent un rôle dans le syndrome toxique de résorption en cas de stase, il apparaît maintenant avec beaucoup plus de vraisemblance que la dégradation brutale *in situ* (sous l'influence d'une concurrence vitale, par substitution d'une nouvelle flore, *Proteus*, anaérobies, etc., ou encore par action chimique des diastases intestinales) d'une aussi grande quantité de germes porteurs d'antigènes toxiques est capable d'éclairer d'un jour nouveau la pathogénie de certains troubles entériques ou d'auto-intoxication. Au surplus, les filtrats de cultures âgées de quinze jours de ces mêmes souches d'*Aerobacter*, choisies parmi celles à endotoxines les plus actives, quand on les injecte à des doses de 0,5 et de 1 c. c. par voie intrapéritonéale chez le rat, se montrent parfaitement inoffensives. Il y a là un contraste saisissant. Certes, le caractère antigénique même de ces extraits glucido-lipidiques est là pour nous rappeler que l'organisme présente ou doit présenter une immunité réelle et continuellement entretenue à l'égard de ces germes qui transitent, et dont un certain nombre sont normalement dégradés ou détruits dans le côlon, mais il est deux cas dans lesquels la libération brusque d'endotoxine semble pouvoir produire des effets sensibles : en premier lieu à l'époque du sevrage, et en particulier au moment où subitement la flore bacillaire Gram négative se substitue chez un nourrisson non immunisé à la flore anaérobie « bleue » si bien étudiée et décrite par Henri Tissier ; et en second lieu au cours des états de stase colique survenant brutalement (occlusion par exemple). Sans vouloir, dès à présent, faire jouer un rôle exclusif aux antigènes glucido-lipidiques de la flore à bacilles Gram négatifs dans les accidents enregistrés, il y a lieu de retenir, comme hypothèse de travail, d'une part leur existence chez les colibacilles et *Aerobacter*, et d'autre part leur pouvoir toxique expérimental très élevé par voie intrapéritonéale.

SUR LA NATURE DES COMPOSÉS ANTIGÈNE-ANTICORPS ET SUR LEUR SOLUBILITÉ (*)

par D. DERVICHIAN.

(Service de Chimie physique. Institut Pasteur.)

INTRODUCTION.

La combinaison entre antigène et anticorps se caractérise non seulement par la spécificité mais aussi par l'influence qu'exerce la proportion des composants mis en présence sur la composition du précipité. Ceci est contraire aux lois habituelles de la chimie.

Nous dirons plus loin ce qu'il faut penser des conceptions qui ne font intervenir « que des phénomènes d'adsorption » pour rendre compte de la variation continue dans la composition du précipité. Heidelberger et Kendall [1] l'expliquent en envisageant des équilibres successifs, suivant une loi d'action de masse, entre différents composés définis et introduisent pour cela la notion de multivalence autant pour la molécule d'antigène que pour celle d'anticorps. A la suite des travaux de Landsteiner, différents auteurs, pour expliquer la spécificité, font intervenir l'existence de groupements spécifiques qui dans le cas des protéines correspondent à l'arrangement des acides aminés de placés en place, suivant un certain mode [2]. Dans un article paru en 1932, S. Mudd [3] parle de « correspondance stéréochimique entre les éléments structuraux de l'antigène et de l'anticorps, permettant l'adaptation locale de la configuration et des affinités ». Il pense d'ailleurs que la synthèse de l'anticorps se fait à la surface même de l'antigène.

La structure que j'ai proposée [4] pour les protéines attribue à la molécule deux grandes faces planes sur lesquelles les différents groupes polaires sont disposés suivant un arrangement à symétrie hexagonale. Il s'ensuit que tout motif se répète trois fois sur chaque face, la répétition se faisant par une rotation de 120°. L'existence de cette structure superficielle cristalline dont le motif et l'ordre d'arrangement varient suivant les proportions des différents groupes fonctionnels permet d'entrevoir plus aisément aussi bien le mécanisme de formation des anticorps que celui de l'action

(*) Note présentée à la séance du 7 octobre 1943 de l'Association des Microbiologistes de Langue Française.

des ferments. En collaboration avec P. Grabar [5] nous avons appliqué ces considérations aux combinaisons antigène-anticorps. Elles nous avaient conduits à une définition géométrique de la spécificité et à une notion plus précise de la valence. Nous avons pu ainsi envisager différents arrangements possibles permettant de retrouver certains rapports quantitatifs entre les deux constituants dans les précipités que l'on obtient suivant qu'il y a excès de l'un ou de l'autre.

Il restait néanmoins à expliquer les raisons de l'insolubilité ou de la solubilité des complexes formés et surtout les phénomènes dits « de zone » tels qu'on les rencontre par exemple dans les précipitations toxine-antitoxine diphtérique.

PRINCIPES.

Afin d'analyser les causes de la précipitation et pour expliquer la structure des édifices formés par l'association de l'antigène et de l'anticorps, j'aurai recours aux considérations générales sur la solubilité que j'avais utilisées dans une théorie d'ensemble des colloïdes [6]. J'utiliserai, d'autre part, les conclusions auxquelles j'ai abouti récemment en ce qui concerne la structure micellaire des solutions de savon et leur coagulation [7].

Nous pouvons dire qu'un corps est soluble dans l'eau quand l'affinité de ses molécules pour le solvant est plus grande que leur cohésion mutuelle. Si la cohésion l'emporte sur l'affinité, le corps dissous précipite.

Or, avec de grosses molécules ou des micelles, ces antagonismes entre cohésion et affinité pour l'eau peuvent varier d'une région à l'autre de la particule. Il en résulte que les modes et les vitesses d'agglomération peuvent être différents, suivant la face ou le côté de la molécule ou de la micelle.

Quelle que soit la structure que l'on puisse imaginer pour les molécules protéiques, on admet unanimement qu'elles sont formées d'une partie non-polaire paraffinique et d'une partie polaire ionisée. De ce point de vue, la micelle des savons constitue un modèle idéal pour l'étude des protéines. En effet, les acides gras et leurs sels alcalins ont le grand avantage d'être des corps chimiquement bien définis possédant dans leurs molécules, comme les protéines, une partie polaire ionisée, le groupe-COONa, et une partie apolaire ou paraffinique, la chaîne $\text{CH}^2.\text{CH}^2.\text{CH}^2\dots$. En ce qui concerne la micelle des solutions colloïdales de savon, des déterminations récentes par les rayons X nous la montrent, comme étant formée de deux couches planes de molécules accolées par leurs groupes CH^2 et présentant deux grandes faces externes tapissées par les groupes ionisés COONa [7]. La structure micellaire des savons serait donc semblable à celle que j'ai proposée pour la molécule des protéines [4]. Nous allons mettre à profit cette similitude de structure pour inter-

préter le comportement des solutions de protéines par celles des savons.

Les solutions de savon coagulent, lorsque la température tombe au-dessous d'une valeur déterminée, par suite d'un changement brusque dans l'état cristallin, ce qui motive un accroissement dans la cohésion latérale. Le précipité qui se forme se constitue donc de préférence par accollement latéral des micelles plutôt que par empilement sur les faces ionisées. Aussi les fibres du coagulat sont-elles particulièrement développées suivant les deux directions perpendiculaires à celles des faces polaires. A tel point qu'une première phase métastable de gel transparent plus ou moins rigide peut apparaître avant la coagulation par accollement exclusivement latéral des micelles donnant ainsi des rubans, édifices à deux dimensions, responsables de la prise en masse par leur enchevêtrement. Ce n'est qu'après coup que le développement se fait dans la troisième direction, par empilement sur les faces ionisées, et qu'apparaît le coagulat.

Avec ces renseignements apportés par l'étude des savons, la présomption s'impose que les précipités antigène-anticorps doivent aussi se développer beaucoup plus par accollement latéral des molécules protéiques que par simple empilement sur les faces ionisées. Pour interpréter simplement ces phénomènes, il faudrait renoncer à la notion de *composé* au sens classique du mot et ne pas considérer la plus ou moins grande solubilité comme étant due à la nature propre d'une nouvelle espèce de molécule. On semble oublier que pour avoir un précipité il faut nécessairement qu'un édifice solide formé d'un très grand nombre de molécules se constitue. En 1902, Danysz arrivait déjà à la conclusion que « mélangées ensemble, les toxines et les antitoxines ne forment donc pas un composé unique mais une série de composés dans lesquels l'une des deux substances est plus ou moins imprégnée par l'autre, et qui sont par conséquent plus ou moins actifs. Les antitoxines se fixent *in vitro* sur les toxines et en saturent plus ou moins les affinités sans les détruire... » [8]. Nous insisterons, sous une forme qui peut paraître paradoxale à première vue, sur le point que *ce n'est pas un composé insoluble qui précipite, mais plutôt le précipité qui constitue le « composé »*.

STRUCTURE DES PRÉCIPITÉS.

Dans les conditions mêmes de température et de concentration où se fait la précipitation, autant les molécules d'antigène (G) que celles d'anticorps (A) sont solubles (fig. 1), c'est-à-dire que la cohésion entre chaque espèce de molécules prise à part est plus faible que l'affinité pour l'eau. Mais une fois mélangées la liaison chimique spécifique de G avec A supplée à la cohésion et l'ensemble s'agglomère, les molécules d'une espèce servant de

lien pour celles de l'autre. Ainsi que nous l'avions montré [5], chaque molécule d'antigène A peut, par chacune de ses faces, entrer en contact avec trois molécules d'anticorps et, s'unissant avec elles, contribuer à les lier côte à côte autour de sommets communs. Mais j'ajoute ici que cet accollement doit se poursuivre dans le plan en un pavage hexagonal, de façon à constituer des feuilletés continus de A. Simultanément l'existence des deux faces identiques et parallèles des molécules protéiques plates permet l'empilement et la poursuite d'une autre liaison de proche en

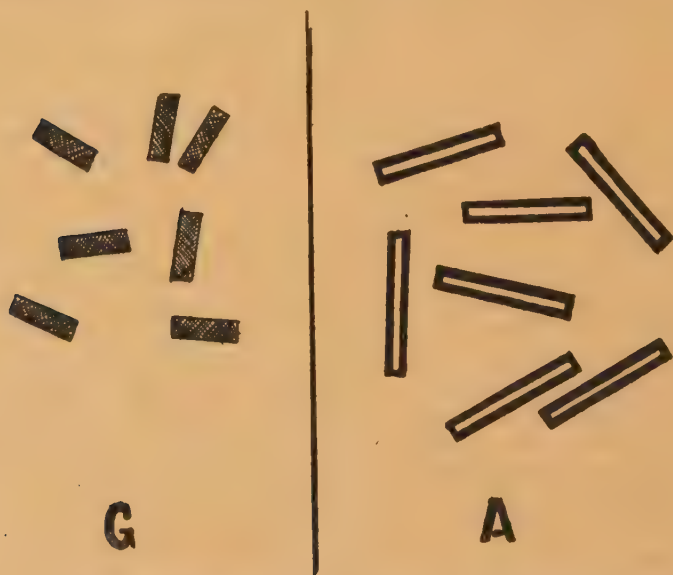


FIG. 1. — Molécule d'antigène (G) et d'anticorps (A) représentées schématiquement, vues par la tranche. Les espèces G et A, isolées l'une de l'autre, sont solubles et ne s'agglomèrent pas.

proche, réalisant des ponts entre couches superposées en sandwiches (fig. 2, AG).

On s'aperçoit que le nombre maximum des molécules G dans un tel édifice ne peut être que dans la proportion de 1 molécule G pour 1 molécule A, puisque chaque A touche 3 G et réciproquement. Mais cette proportion n'est pas nécessaire pour constituer un édifice stable. On devine que les deux modes de liaison, à savoir celui qui accole les molécules A dans chaque feuillet et celui qui les associe dans leur empilement, se favorisent mutuellement dans l'édification de l'ensemble. Cette remarque nous permet de comprendre que des quantités de G en très faible proportion puissent suffire à lier l'ensemble : c'est ainsi que, dans la plupart des cas, la précipitation se produit pour des traces

d'antigène et donne un précipité contenant les deux constituants dans une proportion voisine de celle exprimée par la formule A^3G . En effet, en revenant toujours à notre définition de l'insolubilité comme provenant d'un antagonisme entre cohésion et affinité, on comprend qu'il suffit d'un léger accroissement dans le sens de la cohésion pour renverser l'importance réciproque des deux facteurs. Ainsi il suffit de l'intervention de quelques molécules G de place en place pour aider par ses liaisons chimiques à la cohésion

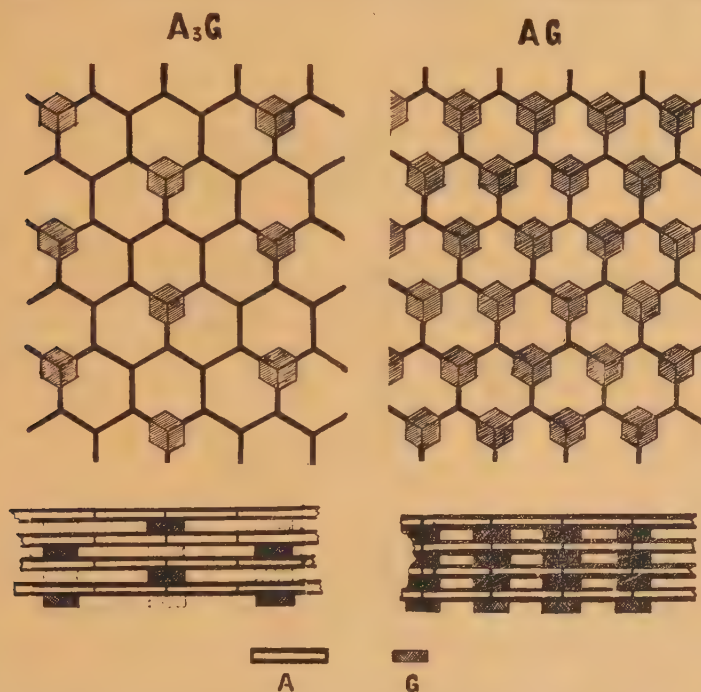


FIG. 2. — Les molécules à symétrie hexagonale de A et de G sont schématisées vues en plan et en épaisseur. Dans le plan, l'accolement latéral des A donne un pavage hexagonal; les G sont appliqués sur ce plan et chevauchent sur trois A adjacents de façon que leur motif spécifique, trois fois répété sur chaque face, coïncide avec le motif correspondant des A. En bas, vu par la tranche, est représenté l'empilement sur les faces polaires. Pour A_3G , tous les emplacements susceptibles d'être occupés par les G ne le sont pas; ils le sont pour AG.

de l'ensemble et entraîner la formation des feuillets, ceux-ci s'accolant les uns aux autres au moyen du même ciment.

Il n'en reste pas moins vrai que l'édifice feuilleté le plus solide se constituera avec un nombre de molécules G voisin de celui qu'implique la formule A^3G . Avec 3 A pour 1 G, on aurait rassemblé sur un même plan et emboîtés les uns dans les autres (fig. 2 A_3G) un ensemble de petits groupes représentés chacun par

la figure *a* de notre précédente note [5]. Il faudrait simultanément isoler par la pensée l'empilement de ces unités, comme elles le sont dans les colonnes de la figure *b* ou *c*, et l'on verrait qu'il suffit d'un très petit nombre de molécules G pour lier entre elles latéralement, de place en place, ces différentes colonnes enclavées côte à côte. Comme on le voit, l'ensemble de l'édifice est formé de feuillets $A^3 G$ superposés, dans lesquels l'emplacement des G est alterné suivant la verticale. Cela se produit dans la zone dite d'équivalence. Avec cette proportion, donnant lieu le plus économiquement à l'édifice le plus solide, la vitesse de formation serait la plus grande ; on comprendrait le sens de la primofloculation de Ramon.

La viscosité de sérums antidiphthérique [9], antisérum de cheval [10] ou antivenin [11] croît très rapidement avec le temps à partir du moment où on leur ajoute l'antigène correspondant pour décroître ensuite dès que commence la floculation. La même particularité a été observée par J. Loiseleur [12] avec des mélanges de ses antigènes et contre-antigène. En rapprochant ce phénomène de la formation du gel qui, dans les solutions de savon précède celle du coagulat, on peut se demander si, dans le cas des composés antigène-anticorps également, l'accolement latéral donnant naissance aux feuillets ne précède pas de quelque temps l'empilement.

INHIBITION ET SOLUBILITÉ.

Si l'on mettait en présence de l'anticorps un nombre de molécules de l'antigène plus grand qu'il n'en faut pour saturer toute une face, c'est-à-dire plus grand que la proportion de 1 G pour 1 A, les valences libres de l'autre face également pourront être occupées. Deux tels feuillets de A, saturés par des G sur leurs deux faces à la fois (fig. 3), n'auraient plus aucune raison de s'accoler : tout se passerait comme si n'étaient en présence que les molécules de l'espèce A seules, les G étant dissimulées. Il n'y aurait donc plus empilement et précipitation mais simple développement dans le plan, ce qui pourrait donner lieu à un énorme accroissement de la viscosité, mais à aucune précipitation. Les associations solubles de A et de G apparaîtraient donc dès que la proportion de 1 G pour 1 A sera dépassée et se poursuivront jusqu'à 2 G pour 1 A. Effectivement, dans toutes les déterminations qui ont été faites par différents auteurs, les proportions d'antigène et d'anticorps combinées dans la région d'excès d'anticorps correspondent aux formules AG ou AG².

La proportion indiquée par AG² ne correspond, d'ailleurs, qu'à l'extrême limite pour ce qui concerne la structure en feuillets. En effet, il n'est pas nécessaire que les deux faces soient entièrement saturées en molécules G pour que les feuillets ne puissent

s'empiler, car dès les premières molécules qui se fixent sur la seconde face tout accollement est rendu impossible. Il apparaît donc que le mot d'*inhibition* ne pouvait pas être mieux choisi pour rendre compte du phénomène qui se produit dans les précipitations antigène-anticorps lorsque l'on dépasse ce que l'on a appelé la zone d'équivalence. L'accolement de nouvelles molécules de G fait, qu'à partir d'une certaine proportion qui n'a qu'un sens de moyenne, l'accolement des différents feuillets n'est plus possible : la précipitation, conséquence de cet empilement, est bien imbibée par l'excès d'antigène. Au point d'équivalence, par définition, au-dessus du précipité, ne reste plus aucune trace ni de G ni de A en excès ; mais la proportion des deux consti-



Fig. 3. — Des feuillets A (vus par la tranche), dont les deux faces sont saturées par des G, ne peuvent plus s'empiler en mettant en commun des G (voir fig. 2). De tels feuillets ne présentant pas d'affinité réciproque se trouvent dans la même situation que les molécules G de la figure 1.

tuants à mettre en présence pour réaliser une telle condition ne peut avoir une signification précise, car les accollements doivent se faire toujours au hasard des différentes associations possibles. Tout est dominé par une question de moyenne et les transitions, ainsi qu'on le constate expérimentalement, ne se font pas d'une façon nette. On comprend que, bien avant d'atteindre la proportion de 1 G pour 1 A, des associations solubles commencent déjà à se former. En effet, dans l'ensemble, certains feuillets n'auront rigoureusement aucune valence saturée sur leur seconde face et pourront par conséquent s'empiler, alors que d'autres feuillets auront accaparé sur leur seconde face tout l'excédent des molécules G et se trouveront solubilisés. Tout ce que l'on peut dire, c'est qu'il n'existe que des zones et, qu'à côté d'une partie qui précipite, il y aura de plus en plus une autre qui restera en solution à mesure que la quantité de G sera plus grande.

IRRÉVERSIBILITÉ.

Deux feuillets étant déjà accolés, bien que restent encore des valences non saturées, les chances pour qu'une molécule d'antigène puisse s'y faufiler sont très faibles, quel que soit le nombre de celles-ci déjà présentes. En plus de l'hétérogénéité due aux fluctuations locales au moment de la formation du précipité il faut donc tenir compte de l'irréversibilité de la combinaison que laisse supposer la remarque que nous venons de faire. En mettant, d'un seul coup, une quantité importante d'antigène, on en immobilise une plus grande quantité entre les feuillets d'anticorps qu'il n'en faudrait pour constituer plus économiquement le même édifice ; c'est le phénomène de Danysz.

Si l'action de masse n'intervient que médiocrement au moment de l'édification, elle le fait encore moins une fois le précipité formé.

Il est concevable que de petites molécules puissent se faufiler entre les feuillets pour aller se substituer à celles qui se sont combinées, mais les chances sont d'autant plus faibles que les molécules que l'on fait intervenir sont plus grosses. On comprend dès lors les échecs rencontrés dans les différentes tentatives qui ont été faites pour dissocier les précipités. De ce point de vue, le résultat négatif des essais systématiques entrepris récemment par Machebœuf et Viscontini [13] pour éluer les agglutinines par des solutions d'acides aminés est très instructif.

On sait que les haptènes simples inhibent la précipitation antigène-anticorps, mais ne précipitent pas eux-mêmes. Nous dirons que ces petites molécules, grâce à leur spécificité, satureront les valences, mais ne peuvent ni lier latéralement les molécules de l'anticorps, puisqu'elles ne peuvent, comme la molécule de G, chevaucher sur trois hexagones adjacents, ni favoriser l'empilement en sandwichs du fait de l'absence de la double face qui constituerait le caractère essentiel des molécules des protéines ou des polysaccharides (1).

PHÉNOMÈNE DE ZONE.

Si d'une façon générale les premières traces d'antigène suffisent à donner un précipité contenant l'anticorps correspondant,

(1) On sait que certains polysaccharides réagissent spécifiquement avec des anticorps correspondants. Si la précipitation relève du même mécanisme, nous sommes obligés d'admettre que la molécule de ces haptènes présente également deux faces polaires pouvant donner lieu à la liaison par empilement. Or ceci est d'autant plus vraisemblable que d'après la structure moléculaire que l'on attribue aux polysides, les chaînes d'oses comportent des groupements polaires aussi bien sur une face que sur l'autre.

ainsi qu'on le sait, il n'en est pas de même dans le cas de l'antitoxine diphtérique où la floculation ne se produit qu'à partir d'une certaine dose de toxine. On a dit que les composés contenant peu d'antigène étaient solubles dans ce cas, mais ce n'est pas là une exception et il est possible d'en prévoir les causes. Le point à retenir est que ce n'est pas la solubilité du composé qui intervient après coup, mais bien plutôt la solubilité de l'anticorps, avant même la combinaison. Il est évident que la possibilité d'accolement des molécules de A est fonction de leur plus ou moins grande cohésion et que, par suite, il faut d'autant moins de molécules G pour les lier dans un édifice qu'elles sont naturellement moins solubles. On sait que les pseudo-globulines sont plus solubles que les euglobulines. Or, suivant l'animal et suivant l'antigène utilisé, l'anticorps correspondant est une pseudo-globuline ou une euglobuline. Si c'est une euglobuline, la moindre trace d'antigène suffira pour apporter le faible appoint nécessaire à la cohésion et donner un précipité. Au contraire, dans le cas d'une pseudo-globuline, il faudra, pour constituer un coagulat, une dose relativement forte de molécules G. C'est le cas de la toxine diphtérique. Mais, ainsi que l'a fait remarquer Pappenheimer [14], si, chez le cheval, l'antitoxine est une pseudo-globuline, elle est une euglobuline chez le lapin et précipite dès les premières traces de toxine. Par ailleurs, même avec l'ovalbumine et l'anti-ovalbumine, on observe l'un ou l'autre des deux modes de précipitation, suivant qu'il s'agit du cheval (pseudo-globuline) ou du lapin (euglobuline). La solubilité dans les deux zones, qui se trouvent respectivement avant et après l'équivalence, est donc due à deux raisons différentes. Lorsqu'elle se constate dans la région d'excès d'anticorps, elle est due à une insuffisance de la cohésion de l'anticorps (pseudo-globuline soluble) ; celle que l'on trouve dans la zone d'excès d'antigène est due à une véritable inhibition du mécanisme de l'empilement des feuillettes par suite de la fixation des molécules G sur les deux faces.

INFLUENCE DU SOLVANT.

Cette solubilité de l'anticorps est toute relative, aussi on comprend qu'entre certaines limites de concentration la présence d'électrolytes influe sur la composition et les conditions de formation du précipité, puisque la solubilité de la globuline dépend de la concentration en sels. C'est dans le même esprit qu'il faut interpréter les résultats obtenus par Grabar et Oudin [15], en produisant des précipitations en présence d'alcool. Suivant la composition du milieu, l'affinité envers le solvant et la cohésion entre molécules sont différentes et, par cela même, la cohésion supplémentaire amenée par les molécules d'antigène nécessite un nombre plus ou moins grand de ces dernières pour constituer

un édifice. Remarquons toutefois qu'il serait plus intéressant peut-être de modifier la composition du milieu avant la précipitation plutôt qu'après.

DIMENSIONS RELATIVES DES MOLÉCULES D'ANTICORPS ET D'ANTIGÈNE.

Ainsi que nous l'avions signalé dans la note publiée avec P. Grabar, les relations moléculaires empiriques donnant la proportion d'antigène et d'anticorps combinés dans les différentes zones sont à peu près les mêmes pour 7 sur 9 des antigènes différents pour lesquels on possède des données numériques; deux d'entre eux donnent des valeurs très aberrantes, ce sont la thyroglobuline et l'hémocyanine.

Pour amener ces rapports aberrants à se rapprocher des valeurs trouvées avec la majorité des cas, on pourrait faire intervenir un poids moléculaire soit plus petit pour G, soit plus grand pour A, soit les deux simultanément; il s'agit là de protéïdes complexes dont la structure semble particulière, ne serait-ce que d'après les dimensions moléculaires calculées à partir des constantes de dissymétrie de Svedberg. On sait aussi que ces protéïnes donnent relativement facilement des produits de dissociation. Nous avons donc suggéré que dans la combinaison antigène-anticorps c'était probablement ces parties élémentaires de molécule dissociée qui intervenaient. Cela revient à prendre pour G un poids moléculaire deux ou cinq fois plus petit, et les relations se trouvent ainsi améliorées.

Remarquons que ces relations moléculaires empiriques, en ce qui concerne justement les cas aberrants, ont été obtenues en attribuant arbitrairement à la molécule d'anticorps un poids moléculaire de 150 à 160.000 en alléguant que c'est là la valeur pour la plupart des anticorps dont le poids moléculaire a été déterminé et qu'il correspond à celui des sérum-globulines normales. Or, cela est d'autant peu évident que les sérum-globulines antipneumococciques chez le cheval, la vache ou le porc atteignent un poids moléculaire de 910.000. D'ailleurs, ainsi que nous l'avons vu, la nature protéïque de l'anticorps peut varier aussi bien avec l'animal immunisé qu'avec l'antigène. Non seulement rien ne s'oppose donc à ce que dans le cas de l'hémocyanine et de la thyroglobuline les poids moléculaires des anticorps soient plus grands que 160.000, mais on pourrait penser que les conditions mêmes d'association des acides aminés au moment de la synthèse par suite de l'introduction d'un nouveau motif, exigent que la molécule d'anticorps soit toujours plus grande que celle de l'antigène.

Il est intéressant de constater que la présente théorie nous amène à conclure dans le même sens. En effet, d'après ce que nous avons vu, les molécules A doivent pouvoir constituer un

pavage jointif dans l'édifice du précipité ; il faut donc pour cela qu'elles soient plus grandes que les molécules G.

Il serait utile d'effectuer des mesures de poids moléculaire dans des sérums antihémocyanine et antithyréoglobuline, afin de vérifier cette prévision.

RÉACTION CHIMIQUE OU ADSORPTION ?

Nous avons insisté en commençant sur la nécessité de ne pas considérer les produits de l'association antigène-anticorps en tant que composés définis, au sens classique de l'expression. S'il est vrai que la liaison entre les deux constituants, avec la valence triple quelle comporte, présente tous les caractères d'une liaison chimique, par contre, la saturation progressive et laissée au hasard des emplacements sur une surface par les molécules de G a toute l'allure d'un phénomène d'adsorption. Bien plus, quoi qu'il y ait combinaison, la composition n'est pas homogène ni la structure continue, car les molécules de G, enclavées entre les feuillets continus de A, ne sont pas jointives : dans les espaces qui les entourent, il y a place entre les feuillets pour des épaisseurs allant jusqu'à 8 couches de molécules d'eau. Cette eau d'inhibition peut dissoudre petites molécules et électrolytes en équilibre avec les groupes ionogènes des surfaces mêmes de A.

Ainsi, la querelle entre partisans de la théorie d'Ehrlich et de celle de Bordet devient oiseuse : les deux points de vue peuvent se justifier simultanément.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] HEIDELBERGER et KENDALL. *J. exp. Med.*, 1935, **61**, 563.
- [2] MARRACK (J. R.). *The Chemistry of antigens and antibodies*, Londres, 1938.
- [3] MUDD (S.). *J. Immunol.*, 1932, **23**, 423.
- [4] DERVICHIAN (D.). *J. Chimie phys*, 1941, **38**, 67.
- [5] GRABAR (P.) et DERVICHIAN (D.). *Ces Annales*, 1942, **68**, 74. — DERVICHIAN (D.) et GRABAR (P.). *C. R. Acad. Sci.*, 1942, **214**, 195.
- [6] DERVICHIAN (D.). *Bull. Soc. Philomatique de Paris* (sous presse).
- [7] DERVICHIAN (D.). *C. R. Acad. Sci.*, 1943, **217**, séance du 27 septembre et *Bull. Soc. chim. de France* (sous presse).
- [8] DANYSZ (J.). *Ces Annales*, 1902, **16**, 334.
- [9] LECOMTE DU NOUÏ et HAMON. *Ces Annales*, 1936, **56**, 359.
- [10] COPPO (M.). *C. R. Soc. Biol.*, 1935, **118**, 1307.
- [11] LOISELEUR (J.). *C. R. Acad. Sci.*, 1938, **207**, 186.
- [12] LOISELEUR (J.). *Act. Sc. et Indus.*, Hermann, 1942, **933**, 33.
- [13] MACHEBŒUF (M.) et VISCONTINI (M.). *Ces Annales*, 1942, **68**, 555.
- [14] PAPPENHEIMER (A. N.). *J. exp. Med.*, 1940, **71**, 263.
- [15] GRABAR (P.) et OUDIN (J.). *Ces Annales*, 1943, **69**, 195.

ASSOCIATION DES MICROBIOLOGISTES DE LANGUE FRANÇAISE

(Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15^e.)

Séance du 4 novembre 1943.

COMMUNICATIONS (SUITE ET FIN)

'SUR LA TOXICITÉ DU SÉRUM DE *VIPERA ASPIS*

par PAUL BOQUET.

L'hypothèse de C. Phisalix et G. Bertrand (1) selon laquelle la nocivité du sérum de vipère serait due à la présence, dans le sang, de venin issu des glandes parotidiennes, a été combattue par A. Calmette (2), M. Arthus (3), et, plus récemment, par G. T. Castellani (4). En vue de préciser ce point, nous avons mesuré *in vivo* la toxicité et *in vitro* l'activité diastasique du venin de la vipère commune de France (*V. aspis*) et celles de son sérum ; nous avons comparé ensuite l'action du sérum antivipérin sur le venin et sur le sérum de vipère.

Les vipères capturées pendant les mois d'été dans les départements de la Loire-Inférieure, du Rhône, de la Haute-Marne et du Gers, et dont on avait extrait le venin, ont été sacrifiées par section de la tête. Leur sang, après coagulation, laisse exsuder un sérum clair que l'on sépare du caillot par centrifugation. La toxicité du venin recueilli était égale à celle de l'échantillon de venin que nous avons étudié avec E. Césari (5) en 1935.

A la dose minima de 0,35 mg. par kilogramme de poids vif, et par voie veineuse, il tue le lapin en trois à cinq minutes, en coagulant la totalité du sang dans les vaisseaux et dans le cœur. La dose mortelle du même échantillon pour le cobaye de 450 g. est de 0,1 mg. dans la veine jugulaire. A l'autopsie, le cœur et les vaisseaux de l'animal laissent échapper un sang liquide et incoagulable (6).

(1) C. PHISALIX et G. BERTRAND, *C. R. Soc. Biol.*, 1893, **97**, 1099 et 1894, **46**, 747.

(2) A. CALMETTE, ces *Annales*, 1895, **9**, 225.

(3) M. ARTHUS, *Arch. Int. Physiol.*, 1912, **12**, 271.

(4) G. T. CASTELLANI, *Arch. Ital. Sc. Med. Colon. e parassit.*, 1938, **19**, 223.

(5) E. CÉSARI et P. BOQUET, ces *Annales*, 1935, **55**, 307.

(6) E. CÉSARI et P. BOQUET, ces *Annales*, 1935, **55**, 307.

Il faut injecter plus de 1,5 mg. du même produit sous la peau du cobaye pour que mort s'ensuive, au bout de vingt-quatre heures environ. Localement, un volumineux œdème et une escarre humide se développent.

La souris de 18 à 20 g. succombe quelques heures après l'injection intrapéritonéale de 0,05 mg. de venin. Son sang demeure limpide.

Le chauffage à 60° atténue légèrement la toxicité du venin de vipère pour le cobaye, mais il reste sans action sur ses propriétés nocives à l'égard du lapin et de la souris.

Le sérum frais de vipère est beaucoup moins toxique que le venin : pour tuer en une heure environ un lapin de 2 kg., il est nécessaire de lui en injecter au moins 6 c. c. dans la veine. Le sang du cœur ne coagule que lentement après la mort. 10 c. c. du même sérum chauffé pendant trente minutes à 56°, et injecté à un lapin du même poids, sont sans effet ; ce sérum a donc perdu ses propriétés toxiques.

1 c. c. de sérum frais, injecté par voie veineuse, tue la plupart des cobayes en moins d'une heure. Toutefois, certains d'entre eux ne succombent qu'après une lente agonie ; tous présentent à l'autopsie une congestion intense et de petits foyers hémorragiques viscéraux. Leur sang, souvent partiellement hémolysé, coagule lentement.

La même dose, introduite sous la peau, produit en vingt-quatre heures un œdème local et un début de nécrose (tache violette de M. Nicolle).

Il suffit d'injecter 0,1 c. c. de sérum de vipère à une souris de 18 à 20 g., par voie péritonéale, pour la tuer en quelques heures avec des lésions comparables à celles du cobaye éprouvé par voie veineuse. Chauffé à 56°, le même sérum ne produit aucun trouble toxique chez la souris à la dose de 0,5 c. c.

Ces différences entre la toxicité du venin et du sérum de la vipère apparaissent avec plus d'évidence encore quand on étudie *in vitro* les propriétés de ces produits. Le venin de vipère coagule le plasma équin citraté et recalcifié. Il hémolyse par l'intermédiaire d'une lipodase, en présence de lécithine, les hématies de cheval. Ces deux propriétés ne sont pas atténuées par le chauffage à 60° (6). Dans les mêmes conditions, le sérum de vipère ne coagule pas le plasma équin. Il hémolyse les globules de cheval, mais directement, sans l'addition de lécithine. Le chauffage pendant vingt minutes à 56° inhibe cette propriété. L. Mazetti (7) et plus récemment G. C. Bound (8) seraient parvenus à réactiver, par l'addition d'une trace de sérum frais, les hémolysines des sérums chauffés de divers reptiles (9). Ils comparent ces substances aux sensibilisatrices des immunosérums et des sérums naturellement hémolytiques (bœuf, anguille).

Si le sérum de vipère contenait du venin tel qu'il est sécrété par les glandes venimeuses, l'addition de sérum spécifique, à dose suffisante, devrait en inhiber les effets toxiques. Il n'en est rien. En effet, 1 c. c. d'un sérum thérapeutique, qui inactive 1 mg. de venin homologue — la toxicité du mélange étant éprouvée sur la souris par voie péritonéale — ne neutralise pas, dans les mêmes conditions, 5 doses mor-

(7) L. MAZETTI, *Zeitschr. Immunistätst.*, 1914, **48**, 132.

(8) G. C. BOUND, *J. Immunol.*, 1939, **36**, 1.

(9) Au cours d'essais répétés, nous ne sommes pas parvenu à réactiver les propriétés hémolytiques du sérum chauffé de vipère.

telles de sérum de vipère, soit 0,5 c. c., quantité correspondant à 0,25 mg. seulement de venin, si l'on admet qu'une dose mortelle de sérum vipérin correspond à une dose mortelle de venin.

De l'ensemble de ces constatations, il apparaît que les principes dont relève la toxicité du venin et du sang de la vipère présentent des propriétés distinctes dans certaines de leurs manifestations.

La nocivité de ces deux produits diffère quantitativement, mais la différence est plus marquée en ce qui concerne leurs caractères diastatiques et leur sensibilité à l'action neutralisante du sérum antivenimeux spécifique.

(Institut Pasteur, Annexe de Garches.)

PRODUCTION EXPÉRIMENTALE DE TUMEURS DES RACINES PAR INOCULATION D'UN MYXOMYCÈTE (*SPONGOSPORA SUBTERRANEA*)

par M^{lle} Y. DOUCHEZ.

Le *Spongospora subterranea* est un Myxomycète qui provoque chez les tubercules de Pomme de terre la maladie appelée « gale poudreuse ». Il détermine la formation sur les racines de petites tumeurs que nous avons décrites dans un précédent travail (1). Nous avons par la suite tenté de réaliser l'infection expérimentale de plantes cultivées aseptiquement et de reconstituer ainsi le cycle évolutif de ce Myxomycète.

L'expérience fut réalisée sur des tomates obtenues aseptiquement à partir de semis de graines en tubes en présence d'un milieu nutritif minéral, les graines étant préalablement stérilisées par immersion de six heures dans l'eau oxygénée. Au milieu de culture on ajoute quelques gouttes d'une suspension de spores provenant du broyage de tumeurs spontanées dans quelques centimètres cubes d'eau oxygénée qui sert de désinfectant.

L'examen des plantes, six mois après l'inoculation, a révélé l'existence dans les racines de myxamibes uninucléées dont la présence provoque une hypertrophie sensible des cellules envahies. Ces amibes sont tout à fait semblables à celles obtenues en faisant germer des spores sur un milieu nutritif gélosé. Elles sont souvent groupées autour du noyau de la cellule hôte, lequel réagit à cette attaque par des déformations et une augmentation de volume. Certaines amibes possèdent deux et trois noyaux, il y a eu en ce cas formation de petits plasmodes par fusion des myxamibes.

Enfin, ce qui a permis de certifier que ces amibes avaient bien pour origine les spores de *Spongospora subterranea* ajoutées au milieu de culture, c'est que sur une racine d'une tomate aseptique, inoculée dans les mêmes conditions, nous avons trouvé un léger renflement

(1) Y. DOUCHEZ, ces *Annales*, 1942, 68, 351.

dont la structure histologique s'est révélée parfaitement semblable à celle des nodosités développées spontanément sur les racines de Pomme de terre envahies par ce parasite. Nous avons retrouvé la même structure anatomique : un parenchyme compact indifférencié à grandes cellules bourrées d'amidon et envahies par les plasmodes typiques de *Spongospora subterranea*.

Le cycle évolutif de ce Myxomycète se trouve ainsi connu : la spore germe en donnant une myxamibe uninucléée qui pénètre dans la racine. Le parasite envahit donc la racine à l'état de myxamibe, tandis que, d'après les observations de M. Kundel, la pénétration dans les tubercules serait réalisée par les plasmodes. Dans les cellules hypertrophiées de la racine les myxamibes se fusionnent en donnant des sporanges, ceux-ci, par suite de la nécrose que subissent les tissus dans le sol, sont mis en liberté et germent en redonnant des myxamibes.

(Institut Pasteur, Service de Phytopathologie.)

FRACTIONNEMENT DU SÉRUM DE CHEVAL PAR LES SELS DE PLOMB ET D'URANIUM

Note de MAURICE DOLADILHE présentée par P. GRABAR.

Au sérum dialysé (1) on ajoute goutte à goutte une solution saturée de chlorure de plomb. On sépare ainsi les protéides précipitables par le chlorure de plomb. Pour la commodité de l'exposé nous désignerons ce premier groupe par A.

On dialyse ensuite le surnageant pour enlever l'excès du réactif, puis on le précipite par une solution de nitrate d'urane (2) [0,5 g. p. 1.000]. Cette précipitation qui n'affecte qu'une partie des protéides restants présente le phénomène de zone, c'est-à-dire que si, par l'addition d'un excès du réactif, on dépasse le maximum de la précipitation, une partie du précipité se redissout. Une troisième dialyse permet, en éliminant cet excès, d'insolubiliser cette fraction redissoute. On extrait ainsi les protéides précipitables par le nitrate d'urane lorsque le milieu est déminéralisé ; nous désignerons ce deuxième groupe par B.

Les protéides qui, après cette opération, restent en solution formeront le groupe C ; ils présentent eux aussi un caractère de précipitabilité qui leur est propre ; non précipitables par les sels d'urane (ou de thorium) en milieu déminéralisé ils le sont, en totalité, lorsque le milieu est minéralisé (NaCl).

Ces groupes qui ne sauraient retenir longtemps l'attention par leurs

(1) Le même phénomène a lieu avec le sérum non dialysé, mais la quantité de chlorure de plomb nécessaire est notablement plus importante.

(2) Les sels d'uranium et de thorium sont les seuls, parmi ceux que nous avons étudiés, qui possèdent un pouvoir précipitant suffisant pour éliminer en totalité le groupe B.

seuls caractères de précipitabilité sont susceptibles de la fixer grâce à leurs propriétés anaphylactiques.

Dans ce travail nous avons appliqué à nos réactions anaphylactiques la technique suivante : sensibilisation par injection intrapéritonéale de 1 cg. de la substance étudiée (desséchée, pesée, puis reprise par NaCl à 8,5 p. 1.000) ou de 1/10 de centimètre cube de sérum. Un mois après l'animal est éprouvé par injection intracardiaque de 10 cg. de la substance ou de 1 c. c. de sérum.

Les cobayes préparés par A, B ou le sérum complet subissent toujours le choc anaphylactique mortel lorsqu'on les éprouve indistinctement par A, B ou le sérum complet, mais ne présentent aucun symptôme de choc lorsqu'on les éprouve par C. Les cobayes préparés par C ne sont, au contraire, jamais anaphylactisés ; ils ne réagissent ni à A, B, C, ni au sérum complet.

Les propriétés anaphylactiques du sérum se retrouvent donc, à la fois, dans A et B mais sont absentes de C. Cette inertie anaphylactique de certains protéides a déjà été signalée pour le sérum sanguin (3).

Ce résultat, important en lui-même, serait susceptible de présenter plus d'intérêt s'il était intégré dans la nomenclature officielle, c'est-à-dire si on pouvait relier les groupes A, B, C aux groupes des globulines et des albumines.

C'est dans ce but que nous avons cherché (en nous servant des caractères de précipitabilité et des propriétés anaphylactiques) comment les groupes A, B, C se répartissent dans ces protéides séparés par le sulfate d'ammoniaque puis dialysés ; l'euglobuline précipite, on la dissout dans l'eau physiologique. On prépare ainsi trois solutions : euglobuline (en milieu physiologique), pseudoglobuline, albumine (en milieu déminéralisé).

Recherche de A. — L'euglobuline précipite par le chlorure de plomb (précipitation massive), la pseudoglobuline et l'albumine ne présentent pas même un léger trouble. On peut donc penser que le groupe A est tout entier localisé dans l'euglobuline.

Recherche de B. — Après dialyse destinée non seulement à enlever l'excès de réactif mais aussi à déminéraliser le surnageant de l'euglobuline, on éprouve les solutions par le nitrate d'urane : l'euglobuline ne précipite pas, la pseudoglobuline précipite abondamment et l'albumine très légèrement. On peut donc supposer que le groupe B est réparti inégalement entre ces deux protéides et que l'euglobuline en est dépourvue.

Recherche de C. — On élimine, par dialyse, l'excès du réactif ; les protéides restés en solution présentent les caractères de précipitabilité de C, c'est-à-dire qu'ils ne précipitent par les sels d'urane que si le milieu est minéralisé ; l'euglobuline précipite légèrement, la pseudoglobuline moyennement et l'albumine d'une façon massive. Le groupe C paraît donc se répartir inégalement entre ces trois protéides.

Réactions anaphylactiques. — Ces réactions confirment les hypothèses précédentes. En effet : les cobayes préparés par les fractions présumées A de l'euglobuline, B de la pseudoglobuline ou de l'albumine sont anaphylactisés pour le sérum complet et ses groupes A et B, mais nullement pour son groupe C. Les cobayes préparés par l'une

ou l'autre des fractions présumées C ne présentent, par contre, aucun symptôme de choc, quelle que soit la nature de l'injection d'épreuve (A, B, C ou sérum).

Pour se rendre compte de la répartition quantitative des groupes A, B, C dans les globulines et dans les albumines, nous avons procédé aux mesures suivantes : des volumes égaux de solutions de globulines et d'albumines sont traités, les uns par nos réactifs, les autres par le sulfate d'ammoniaque ; les précipités recueillis sur filtre taré sont desséchés à l'étuve et pesés. On peut ainsi connaître, d'une façon approximative, les pourcentages des fractions A, B, C de l'euglobuline, de la pseudoglobuline et des albumines.

C'est ce qu'indiquent les chiffres inscrits dans le tableau I.

TABLEAU I. — Taux en pour cent des groupes A, B, C contenus dans les globulines et les albumines d'un sérum de cheval.

	A	B	C
Euglobuline	89	0	10
Pseudo-globuline	0	60	37
Albumines	0	16	80

Nous pouvons donc dire que les protéides anaphylactisants A et B sont répartis entre les globulines et les albumines mais concentrés dans les globulines ; le groupe non anaphylactisant C réparti aussi entre ces protéides est, au contraire, concentré dans les albumines.

Les fractions préparées par précipitation saline ne sont pas homogènes ; les albumines (4) par exemple contiennent environ 25 p. 100 de molécules globuliniques. On ne peut s'empêcher de rapprocher nos expériences de ce résultat et de se demander si l'extraction de la fraction de B contenue dans l'albumine ne marque pas une étape vers la purification de ce protéide ?

Cette hypothèse conduirait à identifier C aux albumines purifiées et à conclure que le pouvoir anaphylactisant du sérum sanguin serait l'apanage exclusif de ses globulines, les albumines purifiées étant anaphylactiquement inertes.

(Ecole d'aides de laboratoire de Bactériologie de Dijon.)

(4) TISELIUS, *Tr. Farad. Soc.*, 1937, 33, 524.

IMMOBILISATION PAR LA LUMIÈRE ULTRA-VIOLETTE DES BACTÉRIES RENDUES FLUORESCENTES PAR LA THIOFLAVINE

par JEAN C. LEVADITI.

Les trypanosomes en suspension dans une solution isotonique de thioflavine S (déhydrothiotoluidine acide diméthylée) à 1/5.000 sont immobilisés par les radiations ultra-violettes ($\lambda : 3.660 \text{ \AA}$) puis transformés en éléments arrondis et transparents, alors qu'en l'absence de fluorochrome ils ne sont pas fluorescents et conservent leur mobilité et leur apparence normale. Ce fait, observé par C. Levaditi, Le Van Sen et Reinié (1) à propos de *Tr. brucei* à l'aide d'un dispositif de microscopie en fluorescence, est du même ordre que les actions photodynamiques observées, depuis Tappeiner, par Metzner (2), par de Borchgrave (3) et récemment par Wittebolle et Niemegeers (4). Ce phénomène est reproductible avec *Tr. gambiense* ou *Tr. evansi* et même avec *Glaucoma piriformis*, à condition que l'on prolonge pour ce dernier le temps de l'irradiation. Il n'est cependant pas général car les individus de *Sp. duttoni* (dilution de sang à 1/10 dans du liquide de Tyrode) sont immobilisés dans les mêmes conditions, aussi bien en présence de la thioflavine qui les rend fluorescents, qu'en l'absence de ce fluorochrome.

Avant d'exposer le résultat de recherches analogues effectuées sur des bactéries, il est indispensable de préciser les conditions expérimentales et les limites des conclusions.

La source lumineuse du dispositif de microscopie en fluorescence utilisé consiste en un arc au charbon de 10 ampères, 110 volts dont le rayonnement ultra-violet est sélectionné par une cuve contenant une solution de SO_4Cu à 4 p. 100 et par un écran à l'oxyde de nickel. Le maximum de transmission de cet écran répond à la longueur d'onde $\lambda = 3.660 \text{ \AA}$ et ses limites à $\lambda = 3.100 \text{ \AA}$ et $\lambda = 4.200 \text{ \AA}$. D'autres écrans (Noviol ou Wratten) permettent d'isoler une autre partie du spectre d'émission de l'arc, telle la partie visible ($\lambda > 4.000 \text{ \AA}$) ou uniquement une seule des couleurs qui le composent.

Avec ce dispositif expérimental, la quantité d'énergie reçue par les bactéries reste indéterminée et le mécanisme énergétique exact de toute action photodynamique ne saurait être envisagé : son aspect qualitatif sera seul apprécié.

Résultats. — Lorsque les germes d'une culture de *B. mesentericus*, en bouillon nutritif, âgée de seize heures, sont observés à l'état frais,

(1) C. LEVADITI, LE VAN SEN et L. REINIÉ, *C. R. Soc. Biol.*, 1939, **131**, 480.

(2) P. METZNER, *Biochem. Zeit.*, 1920, **101**, 33 ; 1921, **113**, 145 et 1924, **148**, 498.

(3) O. DE BORCHGRAVE, *Ann. Soc. belge Med. trop.*, 1939, **19**, 495.

(4) P. WITTEBOLLE et L. NIEMEGEERS, *Rev. belge Sci. med.*, 1942, **14**, 79.

à l'aide de ce dispositif, les bactéries mobiles rendues fluorescentes par l'adsorption de thioflavine deviennent immobiles dès qu'elles sont éclairées par le rayonnement ultra-violet. Cette immobilisation est définitive car, lorsque le champ microscopique est éclairé à nouveau avec la lumière blanche atténuée, qui permet de distinguer ces bactéries grâce à leur réfringence différente de celle du milieu dans lequel elles sont en suspension, aucune d'elles ne récupère sa mobilité. Enfin leur forme apparente reste inchangée, contrairement à ce qui a été observé pour les trypanosomes.

Les constatations suivantes expliquent en partie le mécanisme de cette action.

I. Sous l'influence des radiations du spectre visible dont les longueurs d'ondes sont supérieures à $\lambda = 4.000 \text{ \AA}$ et malgré la présence de thioflavine, les germes conservent leur mobilité (5).

II. En l'absence de thioflavine, le rayonnement lumineux, quelle qu'en soit la longueur d'onde, est sans action sur la mobilité des germes. Les longueurs d'ondes utilisées sont en effet supérieures à celles de la région du spectre ultra-violet que M. et M^{me} V. Henry (6) ont reconnu être nocives pour les bactéries et dont Prudhomme (7) a précisé les limites qui sont respectivement $\lambda_1 = 2.300 \text{ \AA}$ et $\lambda_2 = 3.020 \text{ \AA}$.

III. Les formes mobiles de *B. subtilis* et *B. pyocyaneus* ne sont pas douées dans les cultures jeunes de la fluorescence qu'elles acquièrent dans leurs cultures plus anciennes (8). L'examen identique au précédent, en présence également de thioflavine, montre que les germes mobiles qui sont invisibles lorsque la préparation est éclairée par le rayonnement ultra-violet, conservent leur mobilité antérieure. Ils se comportent comme les germes des suspensions dépourvues de thioflavine, alors que les germes mobiles, mais fluorescents en ultra-violet, sont immobilisés définitivement par ce rayonnement. En outre, les formes mobiles des *Enterobacteriaceæ* qui, comme *B. coli* et le *B. paratyphique* B, ne sont pas rendues fluorescentes par la thioflavine (9), ne sont en rien influencées par la lumière ultra-violette, même en prolongeant le temps d'irradiation pendant une minute.

Ceci prouve que le rayonnement violet et ultra-violet dont la longueur d'onde est comprise entre $\lambda = 3.000 \text{ \AA}$ et $\lambda = 4.000 \text{ \AA}$ n'immobilise que les bactéries rendues fluorescentes par la thioflavine et laisse subsister la mobilité des bactéries qui ne sont pas fluorescentes dans ces conditions. Il importe de remarquer à ce propos que ces longueurs d'ondes agissantes sont comprises dans le spectre d'absorption de la thioflavine tel que l'ont établi Giuntini et Reinié et dont le maximum d'absorption est situé à $\lambda = 3.900 \text{ \AA}$ (10).

(5) Dans les mêmes conditions et en présence également de thioflavine, les trypanosomes sont immobilisés par ce rayonnement.

(6) V. HENRY (M. et M^{me}), *C. R. Soc. Biol.*, 1912, 73, 321.

(7) R. PRUDHOMME, *Ann. Fermentations*, 1938, 4, 103.

(8) J. LEVADITI, *C. R. Soc. Biol.*, 1943, 137, 367.

(9) J. LEVADITI et J. GIUNTINI, *C. R. Soc. Biol.*, 1941, 135, 79 et 80, 810 et 814.

IV. La solution de thioflavine irradiée seule dans les mêmes conditions mais pendant une durée de deux heures (11) est sans action en dehors du rayonnement ultra-violet sur les bactéries comme sur les trypanosomes qui conservent leur mobilité antérieure. Ce ne sont donc pas d'hypothétiques produits stables de désintégration de la thioflavine, libérés sous l'influence du rayonnement ultra-violet qui immobilisent les bactéries ou les trypanosomes.

V. L'essai inverse du précédent, consistant à irradier les bactéries ou les trypanosomes avant de les mettre en présence de thioflavine, n'a également déterminé aucune immobilisation.

Conclusions. — En suspension dans une solution étendue de thioflavine, seules les bactéries rendues fluorescentes par la thioflavine sont sensibilisées à l'action du rayonnement lumineux dont les longueurs d'ondes sont comprises entre 3.100 et 4.200 Å. Ces radiations déterminent leur immobilisation immédiate et définitive. Dans les mêmes suspensions, les bactéries non fluorescentes conservent leur mobilité antérieure.

Le même rayonnement seul, ni la thioflavine seule, même irradiée au préalable, ne sont doués d'une telle propriété.

Il s'agit là d'une action photodynamique que produisent les molécules de thioflavine fixées sur les bactéries lorsqu'elles sont activées par absorption des photons de la lumière excitatrice.

La théorie de la fluorescence permet d'invoquer plusieurs hypothèses pour expliquer le mécanisme de cette action (12). La première envisagerait une action directe, chimique ; les molécules de thioflavine passées à l'état activé agiraient directement sur les flagellés ou les bactéries. Dans la seconde, l'action serait indirecte. En effet, au cours de la désactivation des molécules d'un corps fluorescent, l'énergie absorbée n'est pas toute utilisée sous forme de lumière secondaire émise. Une partie se transforme en énergie cinétique dans le milieu fluorescent. C'est cette partie qui agirait sur les flagellés ou les bactéries. Enfin la lumière secondaire émise au cours de la fluorescence pourrait être la cause de cet effet photodynamique, bien que d'après la règle de Stokes sa longueur d'onde soit plus grande que celle de la lumière excitatrice et par conséquent plus éloignée de l'ultra-violet dont les radiations sont nocives pour les bactéries.

(Institut Pasteur, Service de M. P. LÉPINE.)

(10) J. GIUNTINI et L. REINÉ, *C. R. Soc. Biol.*, 1939, **131**, 633.

(11) Avec M. FAGUET nous n'avons constaté aucun changement dans le pH des solutions de thioflavine ainsi irradiées.

(12) F. PERRIN, *Annales de Physique*, 1929, 10^e série, **12**, 169.

LE POUVOIR DE SYNTHÈSE D'*EUGLENA VIRIDIS*

par HISATAKE DUSI.

Depuis que la culture bactériologiquement pure d'*Euglena viridis* a été obtenue par Mainx [1928] (1), cette espèce a fait l'objet des recherches de H. Dusi [1936] (2) et de R. P. Hall [1939] (3). Nous n'avions pas pu réussir la culture en série dans des milieux inorganiques favorables aux autres flagellés photo-autotrophes (expériences réalisées avec deux souches : celle de Mainx et la nôtre). Cependant Hall, en 1939, obtenait la culture en série dans quelques milieux inorganiques et concluait à la possibilité de la nutrition autotrophe. Hall a utilisé des tubes bouchés avec du coton ; or le coton peut apporter au milieu des facteurs de croissance en quantité non négligeable [A. Lwoff et H. Dusi, 1938] (4), même lorsqu'il n'y a pas contact entre le milieu et le coton. Ondratschek a repris en 1940-1941 (5) l'étude d'*Euglena viridis*. D'une part, l'aneurine exercerait un effet considérable sur la multiplication du flagellé et permettrait d'obtenir des cultures cent fois plus abondantes que les cultures témoins. D'autre part, l'auteur tchèque annonce avoir obtenu en milieu peptoné des cultures renfermant jusqu'à 1.300 flagellés par millimètre cube. Or nous n'avons jamais observé, même dans les milieux peptonés les plus favorables, des cultures d'une densité supérieure à 100 flagellés par millimètre cube.

Il est difficile par ailleurs de comprendre comment Ondratschek a cultivé *Euglena viridis* à l'obscurité. En effet, cette Euglène est incapable de se multiplier à l'obscurité, même en milieu peptoné additionné d'acides gras. *Euglena viridis* est une espèce phototrophe obligatoire. Les conclusions d'Ondratschek sont en contradiction avec les résultats de Mainx et les nôtres.

En raison de la divergence de nos résultats et de ceux de Hall, nous avons repris nos expériences sur la nutrition du flagellé dans un milieu à base d'asparagine : MgSO_4 , 7 H_2O 0,1 g. ; KH_2PO_4 0,2 g. ; KCl 0,1 g. ; asparagine gauche 2 g. ; eau bidistillée 1.000, NaOH q. s. pour pH 7,0. Le milieu est additionné après stérilisation soit de chlorure de calcium 10^{-3} et de citrate de fer 10^{-3} à raison de 1 goutte pour 8 c. c., soit de 1 goutte de la solution oligodynamique de Berthelot.

Nous avons tout d'abord examiné l'influence de l'aneurine et de l'amide de l'acide nicotinique. L'aneurine ajoutée à raison de 1 goutte d'une solution de 1 p. 1.000 ou 1 p. 20.000 à 8 c. c., la nicotinamide à raison de 1 p. 10.000, exercent une légère amélioration sur le développement. L'acide ascorbique, solution extemporanée neutralisée, et la lactoflavine sont totalement dépourvus d'action. L'addition simul-

(1) F. MAINX, *Arch. Protist.*, 1928, **60**, 355.(2) H. DUSI, *Arch. Zool. exp. gén.*, 1936, **78**, 133.(3) R. P. HALL, *Arch. Zool. exp. gén.*, 1939, **80**, 61.(4) A. LWOFF et H. DUSI, *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **427**, 53.(5) K. ONDRATSCHEK, *Arch. Mikrobiol.*, 1940, **41**, 89 ; 1941, **42**, 220.

tanée de vitamine B₁, B₂ et C a le même effet que l'addition de vitamine B₁ seule.

La même expérience a été reprise : 1° sur un milieu à base de nitrate de Ca ; 2° sur un milieu à base de phosphate d'ammonium ; nous n'avons pu, dans ces conditions, voir aucun effet de l'aneurine.

La multiplication d'*Euglena viridis*, plus que celle de toutes les autres espèces d'Euglènes étudiées jusqu'ici, dépend de la quantité de lumière. L'intensité de l'éclairage joue un rôle très important dans le déterminisme de la culture.

Nous avons étudié cette influence dans trois milieux : 1° une solution de peptone de soie ; 2° un milieu à la peptone de soie additionné d'extrait de terre ; 3° le même milieu additionné d'urine, et avons constaté que le développement dépendait seulement de l'intensité de la lumière et non de la composition du milieu.

Nos expériences ont été réalisées avec un éclairage intermittent de douze heures sur vingt-quatre par une lampe de 300 watts, dont la lumière était filtrée par une couche d'eau courante. De bonnes cultures ont été obtenues à une distance de 25 à 40 cm. Les cultures sont beaucoup moins abondantes à une distance de 50 à 70 cm. C'est ainsi qu'entre 25 et 40 cm. la densité de la culture atteint 30 à 50 flagellés par millimètre cubé alors qu'il y en a moins de 10 flagellés à 70 cm. C'est là une particularité d'*Euglena viridis*. Nous n'avons pas retrouvé cette propriété chez d'autres espèces d'Euglènes phototrophes obligatoires. L'intensité de l'éclairement qui joue ainsi un rôle fondamental pour le développement dans un milieu peptoné, doit, à plus forte raison, conditionner la culture en milieu minéral. Hall n'a fait aucune allusion à ce facteur très important pour la culture d'*Euglena viridis* et, répétons-le, il est curieux qu'Ondratschek ait pu observer un développement à l'obscurité.

Il nous semble actuellement possible que les succès de nos premières expériences aient été dus à un éclairage insuffisant. Cependant, il faut noter que le développement des cultures en milieu synthétique est toujours très irrégulier, fait déjà noté par Hall. Il semble peu probable, comme le pense Hall, que cette irrégularité soit due aux éléments oligodynamiques. Nous n'avons, pas plus que Hall, réussi à obtenir des résultats meilleurs en enrichissant le milieu en zinc ou en manganèse.

On peut se demander si le développement d'*Euglena viridis* en milieu supposé purement minéral observé par Hall ne tiendrait pas à la présence de traces de substances organiques apportées par le coton. Pour nous, *Euglena viridis* est incapable de se multiplier en milieu purement minéral. Il reste possible cependant que certaines souches montrent un comportement différent de la nôtre et se développent faiblement en milieu inorganique. Il faut en tout cas conclure qu'*Euglena viridis*, espèce phototrophe stricte, à laquelle la lumière est indispensable, n'est pas autotrophe, ou est en tout cas à la limite de l'autotrophie.

(Institut Pasteur. Service de Physiologie microbienne.)

Séance du 2 décembre 1943.

Présidence de M. JACQUES TRÉFOUËL

COMMUNICATIONS

**ANTAGONISME
DU COLIBACILLE ET DES BACTÉRIES PUTRIDES
DANS LE LAIT CONTAMINÉ**

par A. ROCHAIX et F. SIMON.

On sait que parmi les microbes ayant une signification de contamination fécale, que l'on a l'habitude de rechercher dans les liquides comme l'eau, le lait, etc., se trouvent au premier plan le colibacille, auquel on a adjoint depuis quelques années les « bactéries putrides ». Ces dernières sont des microbes paraissant appartenir aux espèces les plus variées mais présentant des réactions biologiques communes les rendant suspects, en particulier dégageant, aux dépens des matières albuminoïdes du milieu, de l'hydrogène sulfuré et du sulfhydrate d'ammoniaque. Ces éléments, qui donnent des colonies noires sur la gélose au sous-acétate de plomb, constituent aussi un élément très significatif de pollution et on ne manque pas de les rechercher.

Or il existe entre colibacille et « bactéries putrides » pouvant exister dans l'eau un antagonisme sur lequel l'un de nous a déjà attiré l'attention (1). Au point de vue du contrôle de la qualité bactériologique de ce liquide, ce fait présente une grande importance. Si l'on ne recherche pas les deux catégories de microbes en même temps, si l'on se contente de rechercher le colibacille seul, comme indice de contamination, il peut être absent ou ne se trouver qu'en quantité insignifiante, alors qu'une contamination très élevée peut être révélée par les résultats positifs de la recherche des « bactéries putrides ». Mais, dans l'eau, le phénomène ne se présente pas très fréquemment. Nous ne l'avons noté que quinze fois sur 1.290 examens. Au cours d'examens de contrôle de pureté bactériologique d'échantillons de lait, nous avons observé cet antagonisme avec une fréquence et une intensité infiniment plus grandes. Sur 157 analyses d'échantillons de lait, reconnus contaminés, dans 37 cas le colibacille n'existait pas, alors que les colonies de « bactéries putrides » se trouvaient en grand nombre. Voici quelques exemples :

(1) A. ROCHAIX et M^{lle} URTINETTE, *C. R. Soc. Biol.*, 1931, **66**, 669.

COLIBACILLE	BACTÉRIES PUTRIDES au litre
0	—
0	100.000
0	50.000
0	250.000
0	200.000
0	250.000
0	50.000
0	150.000
0	50.000
0	250.000
0	250.000

D'autre part, fait que nous n'avions pas observé dans l'eau, où c'était toujours le colibacille qui disparaissait devant les bactéries putrides, nous avons observé la disparition des bactéries putrides devant le colibacille dans 15 cas. Voici quelques exemples :

COLIBACILLE	BACTÉRIES putrides
50.000	0
150.000	0
350.000	0
100.000	0
500.000	0, etc.

Dans une troisième catégorie de cas, sans que l'un ou l'autre des deux microbes ait complètement disparu, l'un domine l'autre avec un écart considérable :

COLIBACILLE	BACTÉRIES PUTRIDES	COLIBACILLE	BACTÉRIES PUTRIDES
50.000	400.000	500.000	150.000
200.000	450.000	500.000	100.000
50.000	350.000	450.000	200.000
50.000	500.000	500.000	200.000
100.000	500.000	500.000	150.000
150.000	500.000, etc.	500.000	50.000, etc.

Cette dernière catégorie de faits est moins démonstrative, mais étant donné la différence du nombre des colonies (nous n'avons retenu que les écarts d'au moins 200.000), il semble qu'on puisse en tenir compte. Dans 19 cas, le nombre des bactéries putrides dépassait de plus de 200.000 celui des colibacilles ; dans 12 cas, c'étaient ces derniers microbes qui étaient les plus nombreux.

La proportion, si l'on ne tient pas compte de cette dernière catégorie, est donc de 33,12 p. 100. Si l'on tient compte de la troisième catégorie, la proportion monte à 52,96 p. 100, alors que, dans l'eau, la proportion n'atteint que 1,24 p. 100. La recherche des bactéries putrides apparaît donc pour le lait d'une importance de premier ordre. L'hydrolyse de la caséine du lait pour 100 a permis d'isoler un certain nombre d'acides aminés contenant du soufre, cystine, cystéine et leurs homologues supérieurs (homocystine, homocystéine), méthionine. Il n'est pas étonnant que les bactéries, ensemencées avec les dilutions de lait sur les milieux de recherche, dégagent plus facilement que lorsqu'il s'agit de l'eau, de l'hydrogène sulfuré. C'est un phénomène analogue à celui

qui se passe dans la recherche de l'hydrogène sulfuré avec des microbes isolés en cultures pures, quand on ajoute au milieu de culture du soufre pulvérulent ; cette addition augmente la production de l'hydrogène sulfuré.

Quant au mécanisme de l'antagonisme, il est difficile à préciser. On pourrait penser, la production de l'hydrogène sulfuré étant intense, qu'il exerce une action bactéricide particulièrement efficace sur le colibacille. Mais cette explication ne peut être retenue. Outre que l'on doit admettre que le colibacille a dû s'accoutumer à vivre en commensal avec les bactéries putrides dans l'intestin de l'homme et des animaux, les expériences de Douris et Beck ne permettent pas de l'accepter. Ces auteurs (2), en effet, ont montré que sur toute une série de microbes, soumis en cultures saturées, à plusieurs reprises, d' H_2S , à l'action bactéricide de ce gaz, c'est le colibacille qui résiste le plus longtemps. D'ailleurs nous avons vu que dans un certain nombre de cas, moins nombreux il est vrai (15 contre 37), ce sont les bactéries putrides qui disparaissent devant le colibacille. Dans ce dernier cas, est-ce l'acidité développée par le colibacille qui intervient ? Des recherches sont en cours pour pénétrer le mécanisme de cet antagonisme, vraisemblablement complexe.

(Institut bactériologique de Lyon.)

LE COMPORTEMENT DES ÉMULSIONS DE BACILLES PESTEUX EN EAU SALÉE PHYSIOLOGIQUE

par G. GIRARD.

Quand il y a dix ans nous avons, avec J. Robic, entrepris d'immuniser l'homme contre la peste au moyen de germes vivants (virus-vaccin E. V. Girard et Robic), nous nous sommes préoccupés de conserver au maximum la vitalité des suspensions vaccinales. A cet effet, nous avons expérimenté, comparativement à l'eau salée physiologique, divers milieux, notamment celui de Sauton, pur ou dilué au quart tel qu'il est utilisé pour la préparation du vaccin BCG, l'eau glucosée et l'eau saccharosée à des concentrations variables, la macération de viande, l'huile d'olive, etc. Dans tous les cas, la destruction des germes a progressé plus rapidement qu'en eau physiologique. Aussi avons-nous adopté le simple soluté de NaCl à 8 p. 1.000 dans l'eau distillée, solution non tamponnée, pour la préparation et la conservation de notre vaccin. A la condition d'être maintenues en glacière autour de 2 à 4°, les émulsions restent vivantes pendant longtemps ; leur densité ne baisse en apparence que très peu après une année, et nous protégeons encore parfaitement le cobaye contre une infection d'épreuve des plus rigoureuses.

(2) DOURIS et BECK, ces *Annales*, 1931, 46, 73.

Nous avons mis à profit cette propriété dans le dépistage de la peste humaine. Il suffit en effet de prélever les sérosités de ganglion ou d'organes sur le malade ou sur le cadavre et de les diluer dans un peu d'eau physiologique pour ensuite, au laboratoire, pratiquer des ensemencements ou des inoculations qui donneront des résultats positifs, après une semaine de conservation parfois, sous réserve que la température à laquelle ces émulsions sont soumises n'excède pas 25° ; c'est le cas des Hauts Plateaux de Madagascar dans la zone d'endémo-épidémie pesteuse (1).

Nous apportons aujourd'hui le résultat des recherches auxquelles nous nous sommes livré aux fins de préciser davantage le comportement du bacille pesteux dans l'eau physiologique, quant à sa vitalité et à sa virulence.

Nous avons préparé des émulsions renfermant environ 2 milliards de germes par centimètre cube au départ de cultures de trois jours à 26° sur gélose nutritive. Ces émulsions ont été maintenues aux températures suivantes : 37°, 32°, 26°, 4°, et, à intervalles variés, nous avons procédé à des ensemencements sur gélose inclinée par étalement d'une ôse (1/200 de centimètre cube). Deux souches ont été étudiées, une virulente, l'autre étant la souche vaccinale E. V.

Avec les émulsions conservées à 37°, les ensemencements ne donnent une culture en nappe que les deux premiers jours et, après douze jours, on n'obtient plus une seule colonie.

Après conservation à 32°, les colonies restent confluentes pendant cinq à six jours, commencent à être isolées après dix jours pour disparaître vers le quarante-cinquième ou cinquantième jour.

Pour les émulsions gardées à 26°, c'est vers le trentième jour que les colonies cessent d'être confluentes ; elles deviennent rares après cent jours et les germes cessent de pousser vers le cent soixantième.

Quant aux émulsions mises en glacière à + 4°, leur vitalité s'accuse dans les résultats suivants : culture en nappe jusque vers le quatre centième jour, nombreuses colonies isolées le six cent quatre-vingt-cinquième jour, très rares le sept cent quatre-vingt-quatorzième avec la souche E. V. Absence de culture après ce délai avec la souche virulente, laquelle, par ailleurs, s'est comportée d'une manière identique à la précédente.

Avec l'émulsion virulente de deux cent vingt jours, nous avons pu tuer par inoculation cutanée (peau rasée et excoriée) 1 cobaye en sept jour, et un autre par inoculation intrapéritonéale de 0,5 c. c. en cinq jours. Une souris qui reçut 2/10 de centimètre cube dans le péritoine de l'émulsion de six cent quatre-vingt-cinq jours mourut de peste en quatre jours. Chez tous ces animaux, le bacille pesteux fut aisément mis en évidence dans les organes et dans le sang. Les résultats de ces inoculations sont d'autant plus intéressants à signaler que la souche en question est loin d'avoir gardé, depuis cinq ans qu'elle est au laboratoire, la virulence qu'elle avait lors de son isolement à Madagascar ; les variations de température qu'elle eut à subir pendant son expédition par avion avaient fortement diminué dès son arrivée sa virulence initiale et des incidents de glacière ont, au cours des trois

(1) G. GIRARD, *C. R. Soc. Biol.*, 1934, **117**, 601 ; *Bull. Soc. Path. exot.*, 1937, **30**, 210 ; 1938, **31**, 669.

années écoulées, réduit encore cette virulence à tel point que nous ne parvenons pas à tuer régulièrement le cobaye par l'épreuve de la peau rasée badigeonnée avec des cultures jeunes ou même avec le broyat d'organes d'animaux qui ont succombé à une épreuve plus sévère.

Enfin, il n'est pas sans intérêt de souligner, et L. Couvy avait déjà fait cette constatation sans y insister spécialement (2), que les bactériophages spécifiques lysent le bacille pesteux aussi bien en eau salée physiologique qu'en bouillon ou en eau peptonée. Or, il est classique d'écrire que les phages n'agissent pas sur des germes mis en suspension ailleurs que dans des milieux nutritifs susceptibles de provoquer leur multiplication. Cette interprétation, d'après E. Wollman, resterait vraie pour ce qui est du bacille de Yersin, malgré l'apparente contradiction des faits. Mais, alors que pour la majorité des germes sensibles à la lyse il faut enrichir l'eau salée avec une quantité suffisante de peptone pour déterminer le phénomène, il suffit pour le bacille pesteux d'une goutte de phage qui apporte avec le principe lytique les éléments indispensables à la multiplication du coccobacille. L'expérience montre effectivement qu'une trace de phage qui entraîne la lyse complète en bouillon ou en eau peptonée ne lyse que très imparfaitement le bacille pesteux en eau physiologique, mais que cette lyse devient totale avec 1 goutte du même phage. Par contre, une trace de phage convient, à condition qu'on additionne l'émulsion de I ou II gouttes de bouillon. Il est possible également que la propriété que possède le bacille pesteux de rester si longtemps vivant en eau physiologique soit liée à une multiplication lente du germe aux dépens des substances libérées par les cadavres microbiens. Quoi qu'il en soit, le fait demeure, et 1 goutte de bactériophage suffit à engendrer la lyse complète d'une émulsion récente, nettement opalescente, de bacilles pesteux en eau physiologique.

En résumé, contrairement à nombre de microbes pathogènes qui ne survivent que peu de temps en eau salée physiologique quand ils ne s'y lysent pas spontanément, le bacille pesteux s'y conserve vivant et virulent pendant près de deux ans. Cette propriété, outre ses applications pratiques rappelées ci-dessus, permet d'avoir toujours sous la main le matériel nécessaire à des inoculations expérimentales sans qu'il soit besoin de procéder à des repiquages.

Une conservation à basse température (2 à 4°) est toutefois indispensable, comme elle l'est au reste pour le maintien de la vitalité, de la valeur antigène ou de la virulence des cultures sur milieux usuels ou encore du matériel en provenance d'animaux pesteux (rate, bubons) immergés dans des milieux appropriés.

(Institut Pasteur, Service de la Peste.)

(2) L. Couvy, *Bull. Soc. Path. exot.*, 1930, 23, 943.

ACTION DU PARA-AMINOPHÉNYLSULFAMIDE (1162 F) SUR LES CULTURES D'AMIBES

(NOTE PRÉLIMINAIRE)

par L. LAMY.

Les recherches concernant l'action des sulfamides sur les Protozoaires sont encore peu nombreuses [Trypanosomes, quelques autres Flagellés (1, 2), Plasmodium, Coccidies] et rien, en particulier, à notre connaissance n'a été publié sur les Rhizopodes.

Nous avons entrepris l'étude de l'action des sulfamides sur les Rhizopodes et nous avons commencé par celle du para-aminophénylsulfamide 1162 F sur deux amibes parasites : *Entamoeba dysenteriae* * et une amibe d'animaux à sang froid, *Entamoeba invadens* (Rodhain, 1934 **).

Les cultures d'*E. dysenteriae* et *E. invadens*, de même que celles des autres amibes parasites, entretenues sur milieu de Dobell modifié (Sérum de cheval coagulé, Ringer Sérum, Amidon de riz) sont des cultures impures, les amibes étant associées à une flore bactérienne très riche.

L'entretien des souches nécessite des repiquages fréquents : tous les quatre ou cinq jours pour *E. dysenteriae*, tous les six ou sept jours pour *E. invadens*. Passé ce temps, les amibes peuvent encore vivre quelques jours dans le milieu, les bonnes cultures pouvant aller jusqu'à huit, dix et parfois quinze jours. En fait, cette durée plus considérable de la vitalité de la culture ne correspond qu'à une survie des amibes ; quant à leur développement, il est arrêté et la plupart des formes sont déjà dégénérées.

C'est le développement rapide de la flore bactérienne qui est la cause des modifications du milieu, de l'arrêt du développement des amibes et de la nécessité des repiquages si fréquents. D'autre part, les cultures impures ne permettent pas de faire des expériences précises et de savoir exactement ce qui revient aux amibes elles-mêmes dans les infections où elles sont présentes.

Nous avons recherché quelle serait l'action de l'addition de para-aminophénylsulfamide au milieu de culture en pensant, *a priori*, que ce sulfamide, pourrait agir :

1° Sur les amibes elles-mêmes ;

2° Sur la flore bactérienne associée, en la détruisant en partie et en ralentissant son développement, ce qui aurait pour effet de prolonger

(1) R. CAILLEAU, *C. R. Soc. Biol.*, 1939, **131**, 873.

(2) A. LWOFF, F. NITTI, M^{me} J. TRÉFOUËL et M^{lle} V. HAMON, ces *Annales*, 1941, **67**, 9.

(*) Souche Pharo provenant du Service de M. R. DESCHIENS.

(**) Souche J. RODHAIN.

la durée des cultures, d'espacer les repiquages et, peut-être, d'arriver à la culture pure.

De nombreux auteurs, dès après la mise au point du milieu de Bœck et Drbohlav, ont déjà tenté cette purification des cultures d'amibes qui permettrait d'arriver aux cultures pures mixtes, puis aux cultures pures. Toute une série de composés chimiques, de désinfectants, de matières colorantes ont été essayés [par Kofoid et Wagener (3), H. G. Johnstone, D. A. Koch (4), B. F. Howitt (5), etc.] sans résultats appréciables. C'est ainsi que Howitt sur *E. gingivalis*, à l'aide du violet de gentiane et de l'acriflavine employés aux concentrations compatibles avec la vie des amibes, ne réduisait que légèrement la flore bactérienne et ne permettait guère que de gagner quelques jours sur les repiquages.

A l'aide du para-aminophénylsulfamide, au contraire, les résultats sont extrêmement appréciables.

Dans cette note préliminaire, nous ne donnerons d'ailleurs que quelques-unes des conclusions que nous avons tirées des expériences faites sur ces deux amibes parasites, et ceci dans le but de définir simplement le travail que nous avons entrepris.

Le 1162 F est ajouté à la solution de Ringer et la solution est stérilisée. A la concentration de 0,5 p. 100 les cultures sont très belles et prospères, la vitalité des amibes est très grande. A 1 p. 100, au contraire, il semble que l'on ait atteint une concentration mortelle. En ce qui concerne les bactéries : dans les tubes témoins, elles sont extrêmement nombreuses après quelques jours. A 0,5 p. 100, elles ne sont pas totalement détruites mais sont considérablement plus rares. Rien qu'à l'aspect extérieur des tubes de culture, d'ailleurs, on peut se rendre compte de la diminution progressive du développement bactérien et prévoir comment sera la culture d'amibes.

Donc l'addition du 1162 F au milieu de culture, dans les conditions indiquées, ne gêne pas les amibes jusqu'à une certaine concentration, elle ne détruit pas complètement la flore bactérienne associée, mais freine beaucoup son développement. Le résultat de cet arrêt de la multiplication bactérienne a pour effet de prolonger pendant très longtemps, non pas la survie des amibes, mais bien leur développement.

C'est ainsi, par exemple, qu'une souche normale d'*E. invadens* repiquée le 21 août 1943 sur milieu sulfamidé était encore vivante et prospère le 20 octobre 1943, c'est-à-dire après deux mois, alors que les amibes du témoin n'ont vécu qu'une douzaine de jours. Une autre culture repiquée le même jour, contrôlée pour la première fois le 13 novembre, c'est-à-dire après quatre-vingt-quatre jours, contenait encore de nombreuses amibes.

En ce qui concerne *E. dysenteriae*, une souche repiquée le 9 octobre 1943 était encore vivante le 15 novembre, c'est-à-dire après plus d'un mois, et il est probable que la culture pourra encore être prolongée.

D'autre part, les souches provenant de milieu sulfamidé, repiquées à nouveau sur milieu sulfamidé s'entretiennent très bien sans perdre de leur vitalité. Comme exemple, nous donnerons celui d'une souche d'*E. invadens* qui, repiquée le 12 octobre 1943 sur milieu sulfamidé

(3) Ch. A. KOFOID et E. H. WAGENER, *Un. Calif. Publ. Zoo.*, 1925, 28, 155.

(4) D. A. KOCH, *Un. Calif. Publ. Zoo.*, 1926, 29, 241.

(5) B. F. HOWITT, *Un. Calif. Publ. Zoo.*, 1926, 28, 173.

à partir d'une culture sulfamidée âgée de cinquante-deux jours, est encore vivante et en pleine évolution le 2 décembre, c'est-à-dire après cinquante et un jours.

Nous donnerons dans de prochaines notes des détails concernant la durée des cultures, le temps dont on peut différer les repiquages, l'influence de la concentration du milieu en sulfamide et du pH de la solution, l'adaptation des amibes au sulfamide, son influence sur la division et la taille des individus ainsi que sur le maintien de la virulence. Mais, dès maintenant, nous pouvons souligner l'intérêt de l'addition du sulfamide 1162 F au milieu de culture normal des amibes, puisque cette addition permet de différer les repiquages d'un temps considérable dont l'optimum sera déterminé et que, peut-être, elle permettra d'obtenir les amibes parasites en culture pure

(Institut Pasteur, Groupe des Services de Parasitologie.)

Paraîtront en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur* les notes suivantes :

Activité antitoxique apparente, titres anti-zéta, anti-alpha et pouvoir anti-infectieux des sérums anti-« perfringens », par M^{lles} M. GUILLAUMIE, A. KREGUER et M. FABRE.

Relations entre la dénaturation et le pouvoir précipitant du sérum antidiphthérique, par J. LOISELEUR, F. NITTI et M^{lle} M. FAURE.

Recherches immuno-chimiques sur le vibron cholérique. III. Mise en évidence de deux constituants toxiques de nature différente dans la toxine cholérique, par P. GRABAR et J. GALLUT.

Essais de fractionnement des peptones bactériologiques. Multiplicité des facteurs antisulfamides, par J. TABONE, F. NITTI et H. MOUSSET.

Recherches sur l'activité antistaphylococcique et le mode d'action de la Pénicilline, par F. NITTI, J. FOSSAERT et M. FAGUET.

L'ion calcium dans la physiologie du leucocyte, par A. DELAUNAY.

Le Gérant : G. MASSON.

ASSOCIATION DES MICROBIOLOGISTES DE LANGUE FRANÇAISE

(Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15°.)

EXTRAIT DES STATUTS :

Article premier. — L'association dite Association des Microbiologistes de Langue Française, fondée en 1937 à Paris, a pour but de grouper les Microbiologistes de langue française et de créer entre eux un lien. Elle a son siège à Paris.

Elle se compose de membres nationaux et de membres étrangers de toutes langues.

La langue française est la langue officielle des Congrès de l'Association.

Art. 2. — Elle est instituée uniquement pour l'étude et la discussion en commun de toutes les branches de la Science microbiologique.

Art. 3. — Peut faire partie de l'Association toute personne remplissant une fonction scientifique dans un laboratoire de Microbiologie (Microbiologie, Pathologie infectieuse, Immunologie, Chimiothérapie, Cancérologie), ou ayant publié des travaux de Microbiologie.

.....
Art. 9. — Les auteurs des communications et démonstrations devront être membres de l'Association. Les étrangers à l'Association ne seront acceptés comme auteurs que s'ils ont pour co-signataires un membre de l'Association, ou s'ils ont été invités par le Bureau à faire une communication, ou si un membre de l'Association ayant assisté aux recherches rapportées se charge de discuter le travail en séance.

Les membres français de l'Association constituent *ipso facto* et de plein droit, la SECTION FRANÇAISE de l'ASSOCIATION INTERNATIONALE DE MICROBIOLOGIE.

En dehors des Congrès, dont la périodicité et la date sont fixées par l'Assemblée Générale sur la proposition du Bureau, l'Association se réunit en séances consacrées à des communications scientifiques, *le premier jeudi de chaque mois* (août et septembre exceptés), à 16 heures. Les séances ont lieu au Grand Amphithéâtre de l'Institut Pasteur ; elles sont publiques.

Les membres désirant présenter des communications sont priés d'en aviser le Secrétaire général, et de lui en communiquer le titre, pour permettre l'établissement de l'ordre du jour de la réunion.

Le texte des communications doit être remis à la séance, établi *ne varietur*, en exemplaire dactylographié original. La bibliographie

des auteurs cités sera établie, conformément aux règles admises par l'Association Internationale de Microbiologie, dans l'ordre suivant : *nom* de l'auteur, *titre* du périodique (en abrégé et en italiques), *année* de publication, *tome* (en chiffres arabes gras), *page*. Les signes t., p., etc., sont supprimés. Les abréviations des noms de périodiques courants figurent sur une liste qui sera adressée aux auteurs sur leur demande. Les figures illustrant le texte doivent être remises avec leurs clichés typographiques, sinon il pourra en résulter des délais de publication. La Rédaction se charge, le cas échéant, de faire faire tous les dessins, graphiques, tracés, et de faire cliquer, aux frais des auteurs, tous les documents qui lui seront adressés à temps, soit huit jours au moins avant la séance, pour parution dans le numéro suivant des *Annales de l'Institut Pasteur*.

En raison des restrictions apportées aux publications par les circonstances actuelles, le texte de chaque communication ne pourra occuper plus de deux pages de l'emplacement réservé dans les *Annales de l'Institut Pasteur*, soit environ 1.200 mots. Les références bibliographiques et les clichés, s'il y en a, seront compris dans cet espace. Toute communication dépassant ce maximum sera retournée à son auteur, ou devra avoir été préalablement acceptée par la Rédaction des *Annales de l'Institut Pasteur*, pour y paraître en Mémoire.

Le Secrétaire général : P. LÉPINE.

Séances du 4 novembre et du 2 décembre 1943.

SOMMAIRE

Sur la toxicité du sérum de <i>Vipera aspis</i> , par PAUL BOQUET	302
Production expérimentale de tumeurs des racines par inoculation d'un myxomycète (<i>Spongospora subterranea</i>), par M ^{lle} Y. DOUCHEZ.	304
Fractionnement du sérum de cheval par les sels de plomb et d'uranium, note de MAURICE DOLADILHE, présentée par P. GRABAR.	305
Action photodynamique de la lumière ultra-violette sur les bactéries rendues fluorescentes par la thioflavine, par C. LEVADITI	308
Le pouvoir de synthèse d' <i>Euglena viridis</i> , par HISATAKE DUSI	311
Antagonisme du colibacille et des bactéries putrides dans le lait contaminé, par A. ROCHAIX et F. SIMON	313
Le comportement des émulsions de bacilles pesteux en eau salée physiologique, par G. GIRARD	315
Action du para-aminophénylsulfamide (1162 F) sur les cultures d'amibes (note préliminaire), par L. LAMY	318